# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN PURINSTOFFWECHSEL DES DALMATINER-HUNDES BEI ERHÖHTER AUFNAHME VON NUCLEINSÄUREN

Stephan Gaebler

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547022_0009

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie, Tierärztliche Fakultät
der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D. Giesecke

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN PURINSTOFFWECHSEL DES DALMATINER-HUNDES BEI ERHÖHTER AUFNAHME VON NUCLEINSÄUREN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Stephan Gaebler
aus
München

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. v. Sandersleben
Referent: Prof. Dr. D. Giesecke
Koreferent: Prof. Dr. W. Kraft

Tag der Promotion: 27. Februar 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG | 1 |
| 1.1. | Die Sonderstellung des Dalmatiner-Hundes im Purinstoffwechsel der Säugetiere | 1 |
| 1.2. | Problemstellung | 5 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN | 7 |
| 2.1. | Versuchstiere und Versuchstierhaltung | 9 |
| 2.2. | Fütterung | 9 |
| 2.3. | Purinbilanzversuche | 13 |
| 2.3.1. | Ablauf der Versuchsperioden | 13 |
| 2.3.2. | Technik der Blutprobenentnahme | 13 |
| 2.3.3. | Technik der Harnsammlung und der Harnprobenentnahme | 13 |
| 2.4. | Infusionsversuche mit (2-$^{14}$C)Urat | 14 |
| 2.4.1. | Vorbereitung und Versuchsablauf | 14 |
| 2.4.2. | Probenentnahme | 15 |
| 2.5. | Biochemische und radiometrische Labormethoden | 15 |
| 2.5.1. | Urat-Bestimmung | 15 |
| 2.5.2. | Allantoin-Bestimmung | 17 |
| 2.5.3. | $^{14}$C- Aktivitätsmessungen | 19 |
| 2.6. | Statistische Methoden | 20 |
| 3. | ERGEBNISSE | 21 |
| 3.1. | Wirkung der Purinaufnahme auf den Purinstoffwechsel | 21 |
| 3.1.1. | Futter- und Wasseraufnahme sowie Harnwerte | 21 |
| 3.1.2. | Urat-Plasmaspiegel nach der Fütterung | 23 |
| 3.1.3. | Urat-Ausscheidung im Harn | 27 |
| 3.1.4. | Allantoinausscheidung im Harn | 27 |
| 3.1.5. | Gesamtpurinausscheidung im Harn | 32 |

3.2. Einfluß der Qualität nutritiver Nucleinsäuren auf den Purinstoffwechsel 38
3.2.1. Futter- und Wasseraufnahme, Harnvolumen, Harnkonzentration 38
3.2.2. Urat-Plasmaspiegel nach der Fütterung 40
3.2.3. Uratausscheidung im Harn 44
3.3. Stoffwechselkinetik und Elimination von Purinmetaboliten bei unterschiedlicher Purinaufnahme 44
3.3.1. Turnover für Urat und Allantoin 44
3.3.2. Eliminationswege für Urat und Allantoin 46

4. DISKUSSION 50
4.1. Metabolisierung und Elimination von Purinmetaboliten 50
4.2. Metabolische Verfügbarkeit von Nahrungspurinen 55
4.3. Allgemeine Folgerungen 57

5. ZUSAMMENFASSUNG 59
SUMMARY 61

6. LITERATURVERZEICHNIS 63

# 1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

## 1.1. Die Sonderstellung des Dalmatiner-Hundes im Purinstoffwechsel der Säugetiere

1916 erkannte BENEDICT die Besonderheit der Dalmatiner-Hunde, Urat in größerer Menge auszuscheiden (BENEDICT, 1916). In dieser Hinsicht differiert der Dalmatiner von anderen Hunderassen und von den meisten anderen Säugetieren, bei denen Allantoin das Endprodukt des Purinstoffwechsels darstellt. Der Mensch und anthropoide Primaten bauen Purinkörper nur bis zum Urat ab. Diesen Arten ist das in den Peroxysomen der Leberzellen lokalisierte Enzym Uricase (EC 1.7.3.3.) das Urat zum Allantoin oxidiert, phylogenetisch verlorengegangen (CHRISTEN et al., 1970).

Bei Vögeln, Landreptilien und manchen Insekten stellt Urat als Endprodukt des Stickstoffstoffwechsels ein wichtiges Ausscheidungsprodukt dar. Dagegen wird Urat bei Fischen und Amphibien zu Harnstoff und bei den wirbellosen Tieren noch weiter bis zum Ammoniak abgebaut (MERTZ, 1973).

Seit 1916 wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Ursachen der biochemischen Besonderheit der Dalmatiner-Hunde zu erforschen. Naheliegend war zunächst die Vermutung, daß der Dalmatiner, ebenso wie der Mensch keine Uricase besitzt. In einigen Untersuchungen an Leberhomogenaten konnte aber Uricase nachgewiesen werden (WELLS, 1918, KLEMPERER et al., 1938). In einer Arbeit wird sogar von einer, im Vergleich zu anderen Hunderassen, höheren uricolytischen Aktivität der Dalmatinerleber berichtet (ANDREINI et al., 1966).

Als einen Hinweis auf einen im Vergleich zu anderen Hunderassen geringeren Uricasegehalt der Leberzellen des Dalmatiners deutete AFZELIUS (1965) seine Beobachtungen an den Peroxysomen der Leber, die er bei Mensch, Nicht-Dalmatiner, Dalmatiner, Ratte und Rind elektronenoptisch verglich. Die typischen Einschlüsse, die das Enzym Uricase

enthalten sollen, fand er bei Ratte und Hund, einschließlich Dalmatiner, bei diesem allerdings in kleinerer Ausbildung als beim Nicht-Dalmatiner. Diese Einschlüsse oder "nucleoids", die AFZELIUS als "Uricosome" bezeichnete, zeigen die gleiche kristalloide Struktur wie sie gereinigte Uricase elektronenoptisch aufweist (HRUBAN und SWIFT, 1964).

Untersuchungen von LATA et al. (1977) an Rattenlebern ergaben einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Aktivität von Uricase und der Größe der kristalloiden Einschlüsse in den Peroxysomen der Leberzellen. Auf diesen Zusammenhang hatten vorher schon einige andere Autoren hingewiesen (HAYASHI et al., 1976, LEIGHTON et al., 1969); andererseits zeigte sich aber, daß ähnliche Einschlüsse auch in der Rattenniere gefunden wurden, die ihrerseits aber keine Uricaseaktivität aufweist (BAUDHUIN et al., 1965). Umgekehrt fanden KRAMAR et al. (1974) in der Leber von Karpfen Uricaseaktivität ohne die typischen Einschlüsse entdecken zu können.

Bei verschiedenen Fischen konnte in der Leber eine peroxisomale und eine lösliche Uricasefraktion mit einer wesentlich höheren Spezifischen Aktivität unterschieden werden (NOGUCHI et al., 1979). Auch bei der Maus wurde Uricase außerhalb der Peroxysomen, nämlich noch im Endoplasmatischen Reticulum und in den Golgi-Vakuolen der Leberzellen entdeckt (MASTER und HOLMES, 1977).

HRUBAN und RECHCIGL (1969) konnten Uricase außer in der Leber auch noch in der Niere von Rind und Hund nachweisen. In der Niere vom Dalmatiner fanden aber weder WELLS (1918) noch KLEMPERER (1938) Uricase. KLEMPERER stellte allerdings auch beim Nicht-Dalmatiner keine Uricase in der Niere fest. Allein aus der Existenz oder der Größe und Häufigkeit der beschriebenen charakteristischen Einschlüsse in den Peroxysomen Rückschlüsse auf die Uricaseaktivität eines Gewebes zu ziehen, scheint somit fragwürdig zu sein.

Der Dalmatiner-Hund resorbiert im proximalen Nierentubulus kein Urat zurück (FRIEDMAN und BYERS, 1948, WOLFSON et al., 1950, KESSLER et al., 1959). Ausgehend von diesem Ergebnis und von eigenen Untersuchungen an

Erythrozyten von Dalmatinern und anderen Hunderassen gelangten HARVEY und CHRISTENSEN (1964) zu der Vermutung, daß beim Dalmatiner ein generalisierter Transportdefekt für Urat vorliegen könnte. Dadurch würde Urat nur in ungenügendem Maße zum offensichtlich vorhandenen Enzym Uricase gelangen. Der Mensch resorbiert etwa 95% (SØRENSEN, 1976), der Nicht-Dalmatiner etwa 50% der filtrierten Uratmenge im proximalen Tubulus zurück (ROCH-RAMEL et al., 1976). In einer neuen Untersuchung stellt ROCH-RAMEL (1977) allerdings auch beim Dalmatiner-Hund eine Reabsorption für Urat fest. Die rückresorbierte Menge beträgt aber maximal 5% des filtrierten Urats.

Im Gegensatz zum Nicht-Dalmatiner sezerniert der Dalmatiner Urat in den Nierentubulus in einem Umfang von etwa 40% des filtrierten Urats (ROCH-RAMEL, 1977), so daß insgesamt etwa 140% der glomerulär filtrierten Menge im Harn erscheinen. Beim Menschen findet man maximal 10% des filtrierten Urats im Harn (SØRENSEN. 1976). Nach den neuesten Erkenntnissen (WEINER, 1979), verhält sich der Dalmatiner demnach bezüglich seiner Nierenphysiologie ähnlich wie das Kaninchen, das nur 20% der filtrierten Urat-Menge reabsorbiert und in den Tubulus etwa 80% sezerniert, so daß insgesamt eine Netto-Sekretion von etwa 160% resultiert (ROCH-RAMEL et al., 1976). Ähnlich verhält sich auch das Schwein, von dem bisher keinerlei Reabsorption bekannt ist (WEINER, 1979).

Eine Nierenschwelle, das heißt ein maximaler Transportratenwert für die tubuläre Urat-Rückresorption ist beim Menschen bestimmt worden; er liegt aber so hoch, daß er bei der Regulation der Urat-Homöostase praktisch keine Rolle spielt (MERTZ, 1973).

Der Dalmatiner besitzt ein im Vergleich zum Menschen sehr effizientes renales Ausscheidungssystem für Urat, das ihn vor den Risiken der Hyperurikämie und den damit verbundenen pathologischen Veränderungen bewahrt. Der Plasma-Uratspiegel für den Dalmatiner wird mit etwa 50 - 100 umol/l angegeben (APPLEMAN et al , 1966, KUSTER et al., 1972, MAZUE et al., 1977) und erreicht damit etwa nur ein Viertel des für den Menschen bekannten Wertes (MERTZ, 1973).

Der Dalmatiner scheidet als Endprodukt des Purinstoffwechsels neben Urat auch Allantoin aus. Über das renale Verhalten von Allantoin ist bisher wenig bekannt, was nicht zuletzt auf die Schwierigkeiten bei der Bestimmung von Allantoin zurückzuführen ist. Im Gegensatz zum Urat, das zu etwa 10 - 15 % an Plasmaproteine gebunden ist (BERTOLINI und MASAREI, 1979), scheint Allantoin nicht gebunden und damit renal frei filtrierbar zu sein (BRIGGS et al., 1977). Die Clearance für Allantoin wird bei der Ratte als etwa gleich groß wie die Glomeruläre Filtrationsrate angegeben (FRIEDMAN und BYERS, 1947, BRIGGS et al., 1977). Eine tubuläre Reabsorption oder Sekretion konnte nicht nachgewiesen werden (BRIGGS et al., 1977). Das Verhältnis von Allantoin - zu Creatininclearance beschreiben YO et al. (1971) für den Dalmatiner und den Nicht-Dalmatiner als nahezu identisch mit etwa 1. Bei geringem Harnfluß ließ sich allerdings eine Reabsorption von Allantoin im proximalen Tubulus nachweisen, die bis zu 40% der filtrierten Menge erreichte. Über den Mechanismus der Allantoinreabsorption oder über eine mögliche Nierenschwelle ist nichts bekannt.

Nach den bisher erörterten Untersuchungen läßt sich nicht entscheiden, ob Niere, Leber oder beide Organe die Eigenart der Urat-Ausscheidung beim Dalmatiner verursachen. Eine Abklärung dieser Frage versuchten Chirurgen mit Transplantationsversuchen.

APPLEMAN et al. (1966) entfernten Dalmatiner-Hunden beide Nieren und setzten jeweils eine neue Niere eines Nicht-Dalmatiners ein: Die für den Dalmatiner typische hohe Urat-Ausscheidung blieb bestehen. Andererseits änderte sich beim Nicht-Dalmatiner die geringe Urat-Ausscheidung nicht durch die Transplantation einer Dalmatinerniere.

Ganz anders war der Effekt nach der Transplantation der Leber. KUSTER et al. (1972) konnten Dalmatiner-Hunde durch Einpflanzung der Leber eines Nicht-Dalmatiners bezüglich der Urat-Ausscheidung zu Nicht-Dalmatinern "verwandeln".Eine, in einen Nicht-Dalmatiner transplantierte Dalmatinerleber bewirkte einen enormen Anstieg der Plasma-Uratspiegel und der Urat-Ausscheidung.

Für die Eigenart des Dalmatiners scheint nach diesen Versuchen allein die Leber verantwortlich zu sein. Mit der Leber kann die Eigenart offensichtlich auch auf andere Hunderassen "übertragen" werden.

Hinsichtlich der Nierentransplantationsversuche ist anzumerken, daß hierbei neben einer allgemeinen antibiotischen, auch eine Behandlung mit dem purinanalogen Immunsuppressivum Azathioprin durchgeführt werden mußte. Zusätzlich wurden bei einigen Versuchshunden Röntgenstrahlen zur Immunsuppression lokal im Nierenbereich angewandt. Durch diese unphysiologischen Versuchsbedingungen wird der Wert der Ergebnisse beträchtlich eingeschränkt.

Urat, bei Primaten das Endprodukt des Purinstoffwechsels kann im Organismus des Menschen nicht weiter verwertet werden. Trotzdem wird Urat zu über 95% renal rückresorbiert. Die Frage nach dem physiologischen Sinn drängt sich hier auf, zumal diese hohe Reabsorptionsquote letztlich die Ursache für die relativ hohen Urat-Plasmaspiegel ist, die den Menschen in besonderem Maße für die Gicht anfällig machen. 1955 stellte OROWAN die bisher unbewiesene These auf, daß auch Urat die Fähigkeit zur Stimulation der Großhirnrinde besitze, wie dies von anderen Purinkörpern z. B. Coffein, bekannt ist. Darauf gründet sich die vage Vorstellung, daß die anderen Spezies überlegenen geistigen Leistungen von Mensch und anderen Primaten, eventuell auch mit auf die hohen Urat-Plasmaspiegel zurückzuführen seien.

## 1.2. Problemstellung

Beim Studium der bisher zum Purinstoffwechsel des Dalmatiners veröffentlichten Literatur fällt auf, daß die Mehrzahl aller Arbeiten qualitative Aspekte behandelt.

Wertvolle quantitative Angaben hat vor allem MAIER (1980) erarbeitet. Der Dalmatiner-Hund wurde von MAIER als Modelltier für Studien mit nutritiver Purinbelastung vorgeschlagen. Zur Ermittlung der unteren Grenze der Ansprechbarkeit auf diätetische Purinbelastung führte er eine Art Purinbilanzversuch mit Bestimmung der alimentären Purinaufnahme

und der Purinausscheidung im Harn durch. Damit konnte erstmals eine quantitative Aussage über die metabolische Verfügbarkeit von Nahrungspurinen sowie über die renale Purinausscheidung aus endogener Synthese beim Dalmatiner getroffen werden. Die Arbeit von MAIER beschränkte sich aber auf eine geringe bis mittlere Purinbelastung und berücksichtigte bei der Purinaufnahme nicht den Anteil der freien Purinbasen, der bei dem als Purinträger verwendeten Single-Cell-Protein etwa 25% der gesamten Purinbasen ausmacht. Die purinreichste von MAIER angewandte Diät entsprach bezüglich ihres Puringehaltes etwa einem Hundefutter aus jeweils zur Hälfte Muskelfleisch und Innereien (MAIER, 1979).

Unbekannt ist bisher, wie der Dalmatiner auf eine noch höhere Purinbelastung reagiert. Zeigt sich dann eventuell ein Einfluß auf die endogene Synthese von Purinmetaboliten? Wie verändert die erhöhte diätetische Purinbelastung das Verhältnis der im Harn ausgeschiedenen Purinmetaboliten zueinander? Wie verhalten sich die Blutspiegel nach der Futteraufnahme? Werden kritische, zur Gicht führende Spiegel erreicht? Ferner ist bisher unbekannt, ob die Qualität der nutritiven Nucleinsäuren Einfluß auf ihre metabolische Verfügbarkeit ausübt. Ebenfalls unbekannt sind bisher quantitative Angaben über die Metabolisierung und Elimination von Purinmetaboliten, insbesondere die Frage nach dem Ausmaß der extrarenalen Purinelimination beim Dalmatiner,die beim Menschen mit bis zu einem Drittel an der gesamten Elimination von Urat beteiligt ist (SØRENSEN, 1960).

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Zur Klärung der in der Problemstellung gestellten Fragen wurden 3 Versuche durchgeführt. In einem Purinbilanzversuch bei verschieden hoher, analytisch ermittelter, nutritiver Purinbelastung sollten zunächst die Purinausscheidung im Harn, sowie der zu erwartende Anstieg des Plasma-Uratspiegels nach der Futteraufnahme quantifiziert werden. Von den Purinmetaboliten wurden Urat und Allantoin, nicht aber die Oxypurine Xanthin und Hypoxanthin gemessen. Es wurde davon ausgegangen, daß der Hund in dieser Hinsicht dem Menschen vergleichbar ist, bei dem nur etwa 3% der gesamten Purinausscheidung als Oxypurine im Harn erscheinen (MERTZ, 1973). Stichprobenartige Harnanalysen auf Oxypurine mittels HPLC konnten diese Annahme bestätigen.

Ein 2. Versuch sollte den Einfluß der Qualität nutritiver Nucleinsäuren auf den Urat-Plasmaspiegel und die Urat-Ausscheidung im Harn zeigen. Dazu wurden 2 purinäquivalente, bezüglich der Qualität ihrer Nucleinsäuren aber verschiedene Diäten verwendet.

Ein 3. Versuch sollte die Fragen nach der Metabolisierung und Elimination von Purinmetaboliten beantworten. Dazu wurde eine Isotopenverdünnungsmethode gewählt, die es gestattet mit relativ geringen Eingriffen am nicht sedierten Tier, also unter möglichst physiologischen Bedingungen zu arbeiten. Diese Versuche wurden im Fließgleichgewicht ("steady state") durchgeführt, das sich bei einer Dauerinfusion von (2-$^{14}$C) Urat nach einigen Stunden einstellte. Aus der konstanten Blutplasmakonzentration ("plateau"), der Infusionsrate und der Ausscheidung über den Harn ließen sich die Eliminations- und Metabolisierungsflüsse ermitteln. Um die für den Menschen bereits erwähnte intestinale Resekretion von Purinmetaboliten mit anschließender "bakterieller Purinolyse" beim Dalmatiner-Hund zu untersuchen, wurden die erwähnten Isotopenversuche im "steady state" mit exhalationsradiometrischen Messungen der Expirationsluft verbunden. Zur Verdeutlichung der Versuchsplanung dient folgendes vereinfachtes Stoffwechselschema (Abb.1): Schematisiert sind Intestinaltrakt, Darmmucosa und Leber um den zentralen Plasmapool gruppiert, in den die $^{14}$C-Urat-Dauerinfusion gelangt.

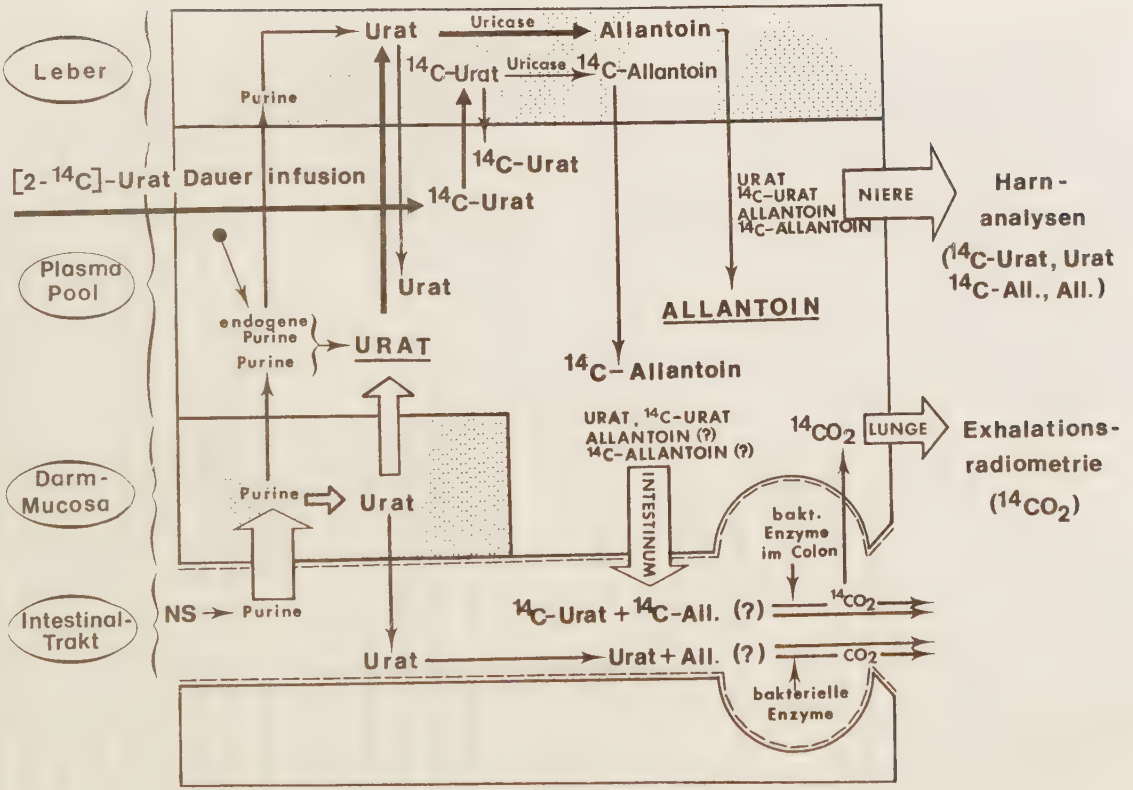



Abbildung 1 : Stoffwechselschema der Purinmetaboliten Urat und Allantoin für die Versuchsplanung (Abkürzungen : NS=Nucleinsäuren, All=Allantoin)

Im "steady-state" ließ sich aus den Spezifischen Aktivitäten der Plasmaproben der Turnover von Urat und Allantoin ermitteln. Die Eliminationswege über Niere und das Intestinum konnten mit Hilfe der Harnanalysen bzw. der exhalationsradiometrischen Messungen in der Expirationsluft quantifiziert werden.

## 2.1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Die Versuche wurden mit 8 reinrassigen Dalmatiner-Hunden durchgeführt, die im Alter von ca. 10 Wochen bei 4 verschiedenen, anerkannten Züchtern gekauft wurden. Bei den Hunden handelte es sich um 4, jeweils gleichgeschlechtliche Geschwisterpaare. Während der versuchsfreien Zeit und bis zum Alter von etwa 1 Jahr wurden die Tiere in Freiausläufen mit Hundehütten untergebracht. Vor Beginn der Versuchsperioden wurden die Tiere mit Mebendazol (Telmin KH $^{R}$) prophylaktisch entwurmt und in einer gegen Ektoparasiten wirksamen Lösung gebadet (Alugan $^{R}$). Während der Versuchsperioden wurden die Tiere in Einzel-Stoffwechselboxen (Firma UNO, Holland) gehalten, die zur Trennung von Kot und Harn mit einem engmaschigen Drahtnetz, ferner mit einer Auffangwanne und einem Kunststoffbehälter für das Sammeln der 24-h-Harnes ausgestattet waren.

## 2.2. Fütterung

In der versuchsfreien Zeit und als purinarme Kontrolldiät wurde in allen Versuchen ein pelletiertes Trockenfutter mit Casein als Hauptei-weißträger eingesetzt (Caseindiät). Für den 1. Versuch (steigende Purinbelastung bei gleichbleibender Nucleinsäurenqualität) wurden 4 verschiedene Diäten gemischt, bei denen 25%, 50%, 75% und 100% des Caseins auf Reinproteinbasis durch ein Einzellerprotein ersetzt wurde (Single-Cell-Protein U 130, Hoechst, Frankfurt am Main). Der Energiegehalt wurde bei allen Diäten durch die Veränderung der Fett- und Ölkomponenten sowie durch das Weizenquellmehl auf etwa 15000 kJ pro kg Futter eingestellt. Wegen des relativ hohen Natriumchlorid- und Phosphorgehaltes des SCP's mußten bei steigender SCP-Zugabe diese Komponenten reduziert

Tabelle 1: Zusammensetzung der Diäten

| Diätkomponenten (g/kg) | Casein-Diät | SCP-25%-Diät | SCP-50%-Diät | SCP-75%-Diät | SCP-100%-Diät |
|---|---|---|---|---|---|
| Weizenquellmehl | 311.3 | 254.6 | 212.9 | 185.7 | 124.0 |
| Casein | 250.0 | 187.5 | 125.0 | 62.5 | ——— |
| SCP-U130 | ——— | 97.4 | 194.7 | 292.0 | 389.4 |
| Haferflocken | 170.0 | 170.0 | 170.0 | 170.0 | 170.0 |
| Haferschalengrieß | 50.0 | 50.0 | 50.0 | 50.0 | 50.0 |
| Rindertalg | 50.0 | 60.0 | 65.0 | 70.0 | 85.0 |
| Sojaöl | 30.0 | 37.0 | 40.0 | 38.0 | 40.0 |
| Malzkeime | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 | 25.0 |
| Grünmehl | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| Blutmehl | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| Tierkörpermehl | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| NaCl | 7.0 | 6.5 | 5.8 | 5.2 | 5.0 |
| Luprosil [R] | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Melasseschnitzel | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 | 3.0 |
| $CaCO_3$ | 18.0 | 30.0 | 40.0 | 40.0 | 50.0 |
| $CaHPO_4.2\ H_2O$ | 27.0 | 20.0 | 10.0 | ——— | ——— |
| Vitaminvormischung [a] | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| Methionin | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| Spurenelementvorm. [b] | 0.58 | 0.58 | 0.58 | 0.58 | 0.58 |

[a] pro g : 1500 µg Vitamin A, 11.1 µg Vitamin $D_3$, 16.7 mg Vitamin E, 0.43 mg Vitamin K, 1.67 mg Thiamin, 2.4 mg Riboflavin, 1 mg Pyridoxin, 10 µg Cobalamin, 30 µg Biotin, 70 µg Folsäure, 6.67 mg Calcium-Pantothenat, 16.7 mg Nicotinsäure, 187 mg Cholinchlorid, 26.7 mg Ascorbinsäure

[b] pro g : 431 mg $FeSO_4.7\ H_2O$, 345 mg $ZnSO_4.7\ H_2O$, 172 mg $MnSO_4.H_2O$, 52 mg $CuSO_4.5\ H_2O$

Tabelle 2: Gehalt der Diäten und des verwendeten SCP U130 an Nucleinsäuren und Purinbasen

| | SCP (g/kg) | RNA | DNA | Freie Purinbasen | Purinbasen gesamt |
|---|---|---|---|---|---|
| | | (mmol/kg) | | | |
| SCP-U130 | 1000 | 71.80 | 27.50 | 31.00 | 130.30 |
| Casein-Diät | 0 | 1.20 | 0.35 | 0 | 1.55 |
| SCP-25%-Diät | 97.4 | 7.82 | 2.99 | 3.38 | 14.25 |
| SCP-50%-Diät | 194.7 | 14.82 | 5.67 | 6.40 | 26.92 |
| SCP-75%-Diät | 292.0 | 21.82 | 8.35 | 9.42 | 39.60 |
| SCP-100%-Diät | 389.4 | 28.80 | 11.03 | 12.44 | 52.28 |

werden. Die SCP-haltigen Diäten wurden entsprechend dem durch das SCP ersetzten prozentualen Anteil mit SCP-25%-Diät, SCP-50%-Diät, SCP-75%-Diät und SCP-100%-Diät benannt. Die Zusammensetzung der Diäten beschreiben die Tabellen 1 und 2.
Für den 2. Versuch (gleichbleibende Purinbelastung durch verschiedene Nucleinsäuren) wurden 3 Diäten gemischt. Neben der bereits erwähnten Caseindiät und der SCP-100%-Diät, die diesmal allerdings mit einer anderen SCP-Charge hergestellt werden mußte (SCP Probion FM-181, Hoechst, Frankfurt am Main), wurde auf der Basis der Caseindiät durch Zugabe von Hefe-RNA (RNA, Sigma GmbH, München), eine Diät erstellt, die bezüglich der Menge an Purinbasen in etwa der SCP-100%-Diät äquivalent war. Diese Diät wurde RNA-Diät benannt.
Die Tabelle 3 gibt nähere Hinweise auf die genaueren Mengen an Purinbestandteilen der beiden Diäten.

Tabelle 3: Gehalt der Diäten an Nucleinsäuren und Purinbasen

| | SCP-100%-Diät (mmol/kg) | RNA-Diät (mmol/kg) |
|---|---|---|
| DNA | 11.5 | 5.0 |
| RNA | 33.0 | 45.0 |
| Freie Purinbasen | 9.4 | 1.4 |
| Gesamte Purinbasen | 53.9 | 51.4 |

## 2.3. Purinbilanzversuche

### 2.3.1. Ablauf der Versuchsperioden

Die Versuchsperioden setzten sich aus einer 14-tägigen Adaptationsperiode und einer 7-8-tägigen Harn-Sammelperiode zusammen. Die Adaptationsperiode verbrachten die Tiere, von einem täglichen, ca. 2 stündigen Auslauf abgesehen, in den Stoffwechselboxen, in denen sie jeweils morgens ad libitum gefüttert wurden. Wasser stand in dieser Periode ganztägig ad libitum über eine Selbsttränkeanlage zur Verfügung. In der sich anschließenden Harn-Sammelperiode erhielten die Tiere 90 % des durchschnittlichen Verzehrs aus der Adaptationsperiode. So wurde eine gleichmäßige tägliche Futteraufnahme erreicht. In der Harn-Sammelperiode war die Selbsttränke außer Betrieb; Wasser wurde in einem Trog ständig ad libitum angeboten, und der Verbrauch nach jeweils 24 Stunden gemessen.

Jeweils am 3. Tag der Harn-Sammelperioden wurden den Tieren insgesamt 5 Blutproben entnommen; die erste nüchtern, kurz vor der Fütterung, die folgenden im Abstand von 2.5 Stunden nach der Fütterung.

### 2.3.2. Technik der Blutprobenentnahme

Blut wurde durch Punktion der Vorderarmvene gewonnen (Kanüle: 0.9 x 38 mm oder 1.1 x 50 mm). Am Anfang der Versuche mußten die Tiere dazu abgelegt werden, später war die Punktion der gestauten Vene auch am stehenden Tier möglich. Die Proben wurden in 10 ml $NH_4$-Heparinat-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen und sofort bei ca. 1100 g 10 Minuten zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde dekantiert, erneut zentrifugiert und nochmals dekantiert. Bis zur Analyse wurden die Plasmaproben bei + 4 $^{o}$C aufbewahrt (ca. 24 Stunden).

### 2.3.3. Technik der Harnsammlung und der Harnprobenentnahme

Die Harn-Sammelperiode dauerte 7 oder 8 Tage. Der Harn wurde in Harnsammelgefäßen, in denen sich zur Vermeidung bakteriellen Wachstums

Thymolkristalle befanden, jeweils 24 Stunden lang gesammelt. Täglich, während der Fütterungszeit wurde der Harn entnommen und mit einem tragbaren pH-Meter (WTW, Weilheim) der pH-Wert bestimmt. Nach der Messung des Harnvolumens und nach gründlicher Durchmischung wurde eine Probe in ein ca. 20 ml fassendes Kunststoffröhrchen abgefüllt.

## 2.4 Infusionsversuche mit $^{14}C$-Urat

### 2.4.1. Vorbereitung und Versuchsablauf

In einem mehrwöchigen Trainigsprogramm wurden 2 männliche und 2 weibliche Dalmatiner-Hunde an das Isotopenlabor und speziell an den freiwilligen Aufenthalt in der für die exhaltionsradiometrischen Messungen notwendigen Plexiglashaube gewöhnt. In dieser Haube sollten sich die Tiere ohne Aufregung etwa eine Stunde aufhalten.

Die Infusionslösung für die Dauerinfusion ( (2-$^{14}C$)Uric acid, 2 G Bq/mmol, Amersham Buchler, Braunschweig), wurde etwa 24 Stunden vor Versuchsbeginn in sterilen Gefäßen mit steriler physiologischer NaCl-Lösung hergestellt und anschließend bei + 4 $^{o}C$ gelagert.

Vor Versuchsbeginn wurden den Tieren Harnkatheter (Dauerkatheter, 8 Charrier, W. Rüsch, Rommelshausen) gelegt und dabei ein Harnkontrollwert entnommen. Die Katheter ließen sich mit Heftpflaster für die Dauer des Versuches gut am Tier befestigen. Die Dauerinfusion erfolgte über einen dünnen Humanvenenkatheter mit Mandrin (Cavafix MT 134, Braun, Melsungen), der unter örtlicher Betäubung in die vena jugularis gelegt und dauerhaft mit Heftpflaster befestigt wurde. Die etwa 8 stündige Dauerinfusion erfolgte mit Hilfe einer Walzenpumpe (Infusomat, Braun, Melsungen) und einem Polyäthylenschlauch, der parallel zur Hundeleine verlaufend, befestigt wurde. Der Dauerinfusion mit einer konstanten Infusionsrate von 10 ml/h wurde eine Kurzzeitinfusion als Startdosis ("priming dose") mit 6.5 ml innerhalb von einer Minute vorangestellt.

Die Fütterung der Hunde am Versuchstag erfolgte kurz nach Infusionsbeginn. 2 Hunde erhielten die Casein-Kontrolldiät, 2 die SCP-100%-Diät (SCP FM-181). Die Hunde waren vorher jeweils 2 Wochen an die Diäten adaptiert worden. Wasser stand während des ganzen Versuches ad libitum zur Verfügung. Während der 8-stündigen Infusion standen die Tiere ständig unter Aufsicht einer ihr vertrauten Person und sie hatten,abgesehen von dem 1-stündigen Aufenthalt in der Kopfhaube,begrenzte Bewegungsmöglichkeiten.

### 2.4.2. Probenentnahme

Harnproben wurden nach Infusionsbeginn etwa alle 45 Minuten gewonnen. Durch leichtes Verschieben des Harnkatheters und manuellen Druck auf die Harnblase wurde versucht die verbleibende Restharnmenge möglichst gering zu halten. Die Blutprobenentnahme erfolgte in etwa 30-minütigem Abstand über eine in die Vorderarmvene des Tieres gelegte Flügelkanüle (1.1 x 19 mm, Surflo, Terumo Corp. Tokyo), die dauerhaft befestigt wurde. Jeweils nach Entnahme der Blutprobe wurde der Kunststoffschlauch der Flügelkanüle mit körperwarmer Heparinlösung (Heparin Novo, 5000 I.E./ml, 1:5 mit 0.9%-iger NaCl-Lösung verdünnt) gefüllt. Protaminsulfat als Heparin-Antidot stand zur Verfügung. Die exhalationsradiometrischen Messungen wurden etwa 5 Stunden nach Infusionsbeginn durchgeführt. Trotz des Trainings waren Messungen, die länger als 50 Minuten dauerten, wegen der dann auftretenden Unruhe der Tiere nicht sinnvoll. Nach dem Versuch wurde der Harn der Tiere 24 Stunden lang gesammelt und über den radioaktiven Abfall beseitigt.

## 2.5. Biochemische und radiometrische Labormethoden

### 2.5.1. Urat-Bestimmung

Die Uratbesimmung im Blutplasma- und in den Harnproben erfolgte mit einem enzymatischen Farbtest (Testkombination: urica quant, Boehringer, Mannheim). Uricase oxidiert dabei spezifisch Urat zu Allantoin.

Dabei entsteht $H_2O_2$, das mit Hilfe von Peroxidase Methanol zu Formaldehyd umwandelt. Dieser reagiert mit Acetylaceton und Ammoniak zu einem gefärbten Produkt, das sich bei 400 - 420 nm im Photometer messen läßt (Eppendorf Photometer, Netheler und Hinz, Hamburg). Plasma wurde für diese Bestimmung unverdünnt eingesetzt, Harn 1 : 10 oder 1 : 20 mit aqua bidest. verdünnt. Alle Bestimmungen wurden mindestens doppelt angesetzt. Zugesetztes Urat wurde mit dieser Bestimmungsmethode im Plasma bei 20 - 190 umol/l zu 98 $\pm$ 2.1% (n = 10) und im Harn bei 4 - 10 mmol/l zu 99 $\pm$ 3.2% (n = 15) wiedergefunden. Die Bestimmung der Spezifischen Aktivität machte eine Isolierung des Urats aus Blutplasma und Harn notwendig. In jeweils 0.5 ml Plasma oder 1 : 10 verdünntem Harn wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Modell M-6000 A, Waters Associates Milford, USA) durch eine halbpräparative Säule (Bondapak TM/C18, Waters, USA) die Urat- und Allantoinfraktion voneinander getrennt. Dabei erfolgte zwangsläufig eine Verdünnung von etwa 1 : 8. Mit Hilfe des variablen Wellenlängendetektors (Modell 450, Waters) und einer analytischen Säule (Bondapak C18, Waters), konnte anschließend die Urat-Konzentration im erhaltenen Eluat beim Absorptionsmaximum von Urat bestimmt werden. Der enzymatische Farbtest ließ sich in diesem Fall wegen der zu geringen Urat-Konzentration nicht mehr anwenden. Für die HPLC-Uratbestimmung wurde ein 0.01 normaler Puffer aus Ammoniumdihydrogenphosphat mit einem pH-Wert von 6.0 gewählt. Bei einer Durchflußgeschwidigkeit der HPLC-Pumpe von 1 ml pro Minute und einer Wellenlänge von 300 nm konnten die besten Resultate erzielt werden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte von Aufzeichnungen eines mit dem variablen Wellenlängendetektor gekoppelten Analogschreibers (LB 922, Berthold, Wildbad).

2.5.2. Allantoin-Bestimmung

Zur Bestimmung des Allantoins im Harn wurde für jedes Tier aus Aliquoten der 8 Harnproben einer Sammelperiode eine Mischprobe hergestellt und zur Analyse eingesetzt. Da beim 1. Versuch das später beschriebene HPLC-Verfahren noch nicht zur Verfühung stand, wurde eine Bestimmungsmethode nach GIESECKE und WIESMAYR (unveröffentlicht) angewandt. Das Prinzip bestand in einer Abspaltung von Harnstoff aus Allantoin und anschließender Bestimmung des Harnstoffs nach der Berthelot-Methode. Der natürlicherweise im Harn vorkommende Harnstoff mußte vorher durch Urease entfernt werden. Zur Überprüfung der vollständigen Spaltung des Harnstoffs sowie der quantitativen Entfernung des dabei entstandenen Ammoniaks, wurde neben einem Leerwert und einer Allantoin-Standardlösung auch eine Harnstofflösung (entsprechend der höchsten Konzentration der zu untersuchenden Harnproben) mit den Harnproben zusammen zur Analyse eingesetzt.

a) Verwendete Lösungen:

I Phosphatpuffer zum Lösen der Urease
(1/15 molar, pH 6.8):
A 4.536 g $KH_2PO_4$ auf 500 ml aqua bidest. auffüllen
B 5.933 g $NA_2HPO_4.2\ H_2O$ auf 500 ml aqua bidest. auffüllen
53.4 ml von Lösung A und
46.4 ml von Lösung B miteinander mischen

II Enteiweißungsmittel nach Fujita, 4fach konzentriert:
a) 13.0 g $CdSO_4$ und
63.5 ml 0.5 molare $H_2SO_4$ mit aqua bidest. auf
250 ml auffüllen
b) 4 molare NaOH

III Urease-Lösung:
pro ml benötigte Lösung wird Urease (EC 3.5.1.5., 5260 U/g, Sigma GmbH, München) entsprechend der Harnstoffkonzentration des Harnes in Puffer I gelöst.

IV Allantoin-Standard-Lösung:
1000 mg Allantoin (Sigma GmbH, München),
auf 1000 ml aqua bidest. auffüllen.
Täglich frisch zubereiten, kühl und dunkel aufbewahren.

Verfahren:

In MSE-Zentrifugenröhrchen (Ø 16 mm) wird zu 1 ml Harn 1 ml Urease-Lösung (III) pipettiert, geschüttelt und 30 min offen im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung der Urease wird mit 2 ml Lösung II a + 1.5 ml Lösung II b enteiweißt und die alkalische Hydrolyse eingeleitet. Das Präzipitat wird 10 min bei circa 38000 g abzentrifugiert und die überstehende klare Lösung quantitativ in Eindampfgefäße überführt, an denen in Höhe des Flüssigkeitsspiegels eine Marke angebracht wird. Die Gefäße werden für 2 Stunden bei 70 °C in den Sample Concentrator (Brinkmann SC/48 R) eingestellt. Um entstehendes $NH_3$ zu entfernen, wird über der Flüssigkeit ein mäßiger Unterdruck erzeugt (Pumpe: Leybold). Durch regelmäßiges Nachfüllen von aqua bidest. wird ein vollständiges Eindampfen verhindert. Nach Beendigung der alkalischen Hydrolyse wird mit HCl gegen Neutralrot neutralisiert und mit Hilfe der Markierung das ursprüngliche Volumen mit aqua bidest. wieder hergestellt. Um die saure Hydrolyse einzuleiten, wird bis zur Endkonzentration von 0.1 molar HCl zugegeben und die Gefäße nochmals bei 70 °C in den Sample Concentrator eingestellt. Nach Beendigung der sauren Hydrolyse wird mit NaOH genau neutralisiert, das Hydrolysat in graduierte Röhrchen quantitativ überführt, auf ein möglichst kleines Volumen aufgefüllt und im Hydrolysat der Harnstoffgehalt nach dem Prinzip Berthelot's bestimmt (Boehringer Testkombination Nr. 124788). Dabei wird Harnstoff durch Urease zu $NH_4CO_3$ abgebaut. Um eventuell noch vorhandenen Restammoniak, der das Ergebnis verfälschen würde, zu bestimmen, wurde jede Hydrolysatprobe geteilt und einmal mit und einmal ohne Ureasebehandlung mit der Boehringer Testkombination bestimmt. Die Wiederfindung zugesetzten Allantoins betrug im Harn bei 3 - 7 mmol/l 88% ± 6.1% (n = 10).

Für die Bestimmung der Spezifischen Aktivität von Allantoin im Plasma und im Harn wurde Allantoin mit dem HPLC-Gerät (mit variablem Wellenlängendetektor) und der halbpräparativen Säule (siehe 2.5.1.), aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten vom Urat abgetrennt. Es wurden wie bei der Isolierung von Urat jeweils 0.5 ml unverdünntes Plasma bzw. 0.5 ml 1 : 10 verdünnter Harn eingesetzt, die während der Trennung auf der Säule durch den verwendeten 0.01 normalen Puffer aus Ammoniumdihydrogenphosphat (pH = 6.0) etwa im Verhältnis 1 : 8 verdünnt wurden. Bei einer Wellenlänge von 218 nm ließ sich Allantoin im erhaltenen Eluat bestimmen. Im Gegensatz zur Uratbestimmung wurde hier eine Durchflußgeschwindigkeit von 0.5 ml pro Minute gewählt. Zugesetztes Allantoin wurde im Plasma bei 20 - 80 umol/l zu 95% ± 6.9% (n = 12) und im Harn bei 3 - 7 mmol/l zu 96% ± 5.7% (n = 12) wiedergefunden. Die Auswertung, der mit einem Analogschreiber aufgezeichneten Peaks erfolgte über eine Allantoinstandardlösung, die täglich frisch angesetzt, kühl und dunkel aufbewahrt wurde.

### 2.5.3. $^{14}C$-Aktivitätsmessungen

Die $^{14}C$-Aktivitätsbestimmung in Plasma- und Harnproben erfolgte in einem Flüssigszintillationszähler (Modell 3375, Packard). Dazu wurden Probenvolumina bis zu 3.5 ml mit jeweils 10 ml Szintillator (Unisolve I, Koch-Light Lab. Ltd.) versetzt und 10 Minuten lang gezählt. Durch Zugabe eines $^{14}C$-Standards bekannter Aktivität konnte durch erneute Impulszählung die Zählausbeute bestimmt werden. Die für die Bestimmung der bakteriellen Purinolyse notwendige Messung der $^{14}C$-Aktivität in der Expirationsluft erfolgte in einem Exhalationsmessgerät (Exhalameter FHT 50 B, Frieseke und Hoepfner GmbH, Erlangen-Bruck). Dabei wurde gleichzeitig der $CO_2$-Gehalt durch Infrarotspektrometrie und die $^{14}C$-Aktivität durch einen Methandurchflußzähler mit einem Nutzeffekt von 13,5% ermittelt. Ein Dreipunktschreiber druckte diese Werte sowie deren Quotient ständig aus. Außerdem wurden die $^{14}C$- sowie die $CO_2$- Exhalation über die Meßzeit fortlaufend integriert. Die pro Zeiteinheit ausgeatmete $^{14}C$-Aktivität a (Bq/min) ließ sich aus der gemessenen Impulsrate I (Imp./min), der Gasdurchflußmenge GF ($cm^3$/min) und einer Eichkonstanten k nach folgender Formel berechnen:

$$a = \frac{I.GF}{k}$$

## 2.6 Statistische Methoden

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit ihrer Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) angegeben. Unterschiede zwischen Stichproben von den gleichen Tieren bei unterschiedlicher Behandlung wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen (SACHS, 1972) auf Zufallswahrscheinlichkeit geprüft. Die Berechnung von linearen Regressionen und Korrelationskoeffizienten erfolgte ebenfalls nach den von SACHS (1972) angegebenen Methoden. Die erhaltenen Korrelationskoeffizienten wurden mit Hilfe der Geigy-Tabellen (Documenta Geigy, 1968) auf Zufallswahrscheinlichkeit geprüft.

3. ERGEBNISSE

3.1. Wirkung der Purinaufnahme auf den Purinstoffwechsel

3.1.1. Futter- und Wasseraufnahme sowie Harnwerte

Die Tabelle 4 gibt die Futter- und Wasseraufnahme, das Harnvolumen, die Harnkonzentrationen von Urat und Allantoin und die Harn-pH-Werte an.

Tabelle 4: Futter- und Wasseraufnahme, Harnvolumen, Harnkonzentrationen und Harn-pH-Wert. Vergleich der 5 Diäten. (Mittelwert von 8 Tieren und jeweils 8 Meßtagen)

| Diät (Puringehalt mmol/kg) | Futter-aufnahme (g/kg LM) | Wasser-aufnahme (ml/kg LM) | Harn-volumen (ml/kg LM) | Harn-konzentrationen (mmol/l) Urat | Allantoin | pH-Wert im Harn |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Casein | 18.4 | 44.6 | 28.0 | 4.0 | 3.6 | 6.50 |
| (1.55) | ± 2.9 | ±11.2 | ± 9.6 | ±0.8 | ±1.1 | ±0.24 |
| SCP-25% | 14.1 | 36.6 | 22.1 | 6.2 | 4.9 | 6.40 |
| (14.25) | ± 2.2 | ± 7.6 | ± 5.1 | ±1.5 | ±1.2 | ±0.22 |
| SCP-50% | 14.7 | 45.9 | 29.0 | 8.5 | 5.1 | 6.21 |
| (26.92) | ± 2.6 | ±13.5 | ±11.7 | ±1.8 | ±2.1 | ±0.31 |
| SCP-75% | 14.9 | 51.3 | 35.8 | 8.0 | 4.9 | 6.41 |
| (39.60) | ± 3.2 | ±11.7 | ±10.7 | ±1.8 | ±1.8 | ±0.41 |
| SCP-100% | 10.9 | 46.1 | 32.4 | 9.4 | 6.4 | 6.36 |
| (52.28) | ± 1.9 | ± 8.6 | ± 6.0 | ±1.2 | ±1.3 | ±0.16 |

Wie Tabelle 4 zeigt, war der Futterverzehr bei allen Single-Cell-Protein-haltigen Diäten, besonders aber bei der SCP-100%-Diät im Vergleich zur Casein-Diät deutlich erniedrigt. Eine Erklärung hierfür ist wohl im etwas unangenehmen Geruch und Geschmack des Single-Cell-Proteins zu suchen. Die Casein-Diät wurde von allen Hunden jeder SCP-haltigen Diät vorgezogen, wenn zwischen beiden die Wahl bestand. Der pH-Wert des Sammelharnes konnte im Mittel über alle Diäten mit 6.4 $\pm$ 0.28 gemessen werden. Eine Beeinflussung des Harn-pH-Wertes durch die steigende Nucleinsäurenbelastung ließ sich nicht feststellen. Die Urat-Konzentration im Harn wurde durch den pH-Wert im Harn ebenfalls nicht beeinflußt. Zwischen den in Tabelle 4 angegebenen Daten konnten folgende Beziehungen hergestellt werden:

Tabelle 5: Regressionen und Korrelationen der Daten in Tabelle 4

| | b | a | r | n | p< |
|---|---|---|---|---|---|
| Wasseraufnahme in ml (x), Harnvolumen in ml (y) | 0.61 | 56.7 | 0.90 | 8 | 0.01 |
| Purinaufnahme in mmol (x), Wasseraufnahme in ml (y) | 134.4 | -81.9 | 0.64 | 8 | 0.1 |
| Purinaufnahme in mmol (x), Harnvolumen in ml (y) | 93.7 | -79.9 | 0.66 | 8 | 0.1 |

Der durch die Daten in Tabelle 5 zu vermutende Zusammenhang zwischen dem Harnvolumen (bzw. der Wasseraufnahme) und der Purinaufnahme konnte statistisch bei einem Stichprobenumfang von n = 8 (8 verschiedene Hunde) nur mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 10% bestimmt werden. Bei gleichbleibendem Harnvolumen wären wahrscheinlich wesentlich höhere Konzentrationen der Purinmetaboliten im Harn gefunden worden. So erhöhte sich zum Beispiel die Urat-Konzentration im Harn zwischen den Diäten SCP-25% und SCP-50% nur um 37%, wogegen sich die Purinaufnahme zwischen diesen Diäten fast verdoppelte (Tab. 9).

### 3.1.2. Urat-Plasmaspiegel nach der Fütterung

Plasmaproben wurden kurz vor, bzw. 2.5, 5, 7.5 und 10 Stunden nach der Fütterung gewonnen. Der Verlauf der Urat-Plasmakonzentration nach verschieden hoher alimentärer Purinbelastung sollte festgestellt werden. Die Nüchternwerte lagen bei allen Diäten relativ nahe beieinander, wobei der Nüchternwert der 4 weiblichen Tiere im Mittel etwa 7% niedriger lag als der der männlichen Tiere. Statistisch konnte diese Differenz nicht gesichert werden. Außer bei der Casein-Diät, bei welcher die Plasmaspiegel im Verlauf von 10 Stunden nach der Fütterung signifikant absanken, war bei allen Diäten noch 7.5 Stunden nach der Futteraufnahme, bei den SCP-Diäten 75% und 100% auch noch nach 10 Stunden eine signifikante Erhöhung der Urat-Plasmaspiegel gegenüber dem Nüchternwert festzustellen (Tab. 6). Die Abb. 2 zeigt die Urat-Plasmaspiegel in Abhängigkeit vom Fütterungszeitpunkt bei unterschiedlich hoher alimentärer Purinbelastung. Aus dem nahezu linearen, abfallenden Teil der graphischen Darstellung der Urat-Plasmaspiegel (Abb.2) zwischen der 5. und 10. Stunde nach der Futteraufnahme ließe sich durch lineare Extrapolation ein theoretischer 12-h-Wert ermitteln, der bei allen 4 SCP-Diäten etwa auf dem Niveau des Nüchternwertes liegen würde.

Die Beziehung zwischen Purinaufnahme und Urat-Plasmakonzentration für die Zeit 5 Stunden nach der Fütterung geht aus Abb. 3 hervor. Aus der Regressionsgleichung läßt sich ein Plasma-Uratspiegel von 31.69 µmol/l für eine völlig purinfreie Ernährung ermitteln. Aus der Gleichung er-

Tabelle 6: Urat-Konzentrationen im Plasma nach Fütterung der verschiedenen Diäten

| Diät | Urat-Konzentrationen im Plasma (µmol/l) | | | | | n |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Zeit nach Fütterung (h) | | | | | |
| | 0 | 2.5 | 5 | 7.5 | 10 | |
| Casein | 45.3 ± 8.8 | 32.9[a] ± 12.1 | 26.2[a] ± 11.3 | 24.2[a] ± 7.1 | 25.3[a] ± 9.1 | 16 |
| SCP-25% | 47.6 ±12.9 | 70.9[c] ± 13.9 | 79.6[c] ± 19.9 | 66.8[b] ± 33.0 | 48.5 ±26.3 | 8 |
| SCP-50% | 58.7 ±15.4 | 113.4[c] ± 18.8 | 123.1[c] ± 25.9 | 98.3[c] ± 25.5 | 65.3 ±19.8 | 8 |
| SCP-75% | 56.0 ±13.7 | 145.4[c] ± 28.1 | 159.7[c] ± 15.8 | 121.7[c] ± 28.6 | 80.9[c] ±16.3 | 8 |
| SCP-100% | 50.9 ± 7.4 | 160.4[c] ± 29.9 | 185.5[c] ± 39.7 | 138.5[c] ± 26.4 | 86.8[c] ±13.6 | 8 |

[a] Abfall gegenüber dem Nüchternwert signifikant mit $p < 0.05$

[b] Anstieg gegenüber dem Nüchternwert signifikant mit $p < 0.05$

[c] Anstieg gegenüber dem Nüchternwert signifikant mit $p < 0.01$

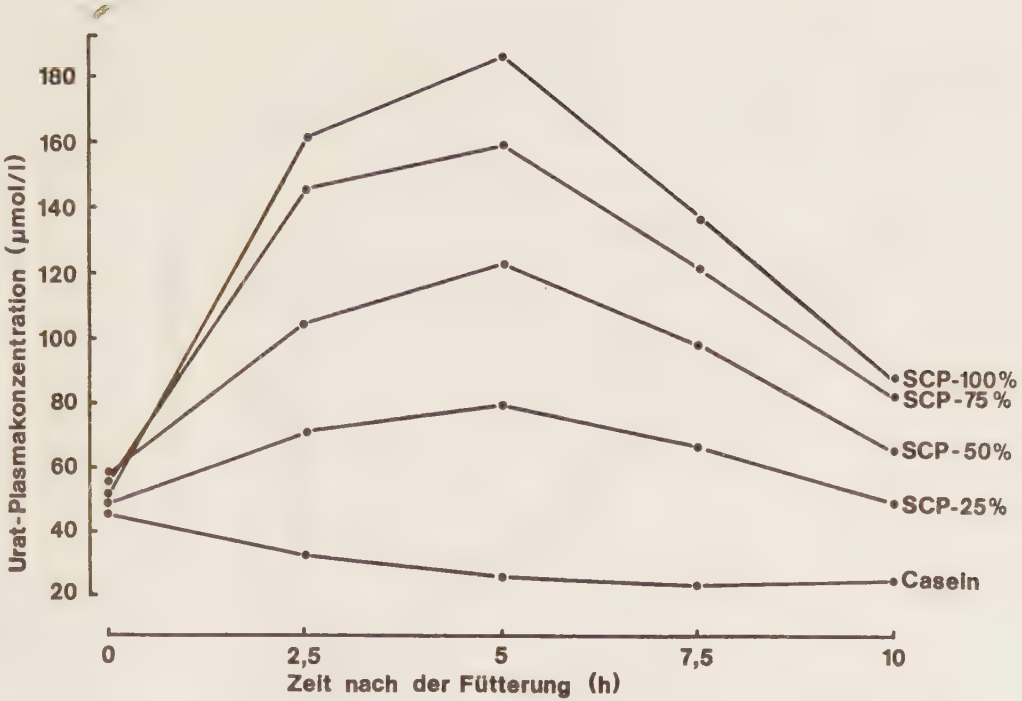



Abbildung 2 : Verlauf der Urat - Plasmakonzentration ( µmol/l ) nach Fütterung der Diäten mit verschiedenem SCP-Gehalt

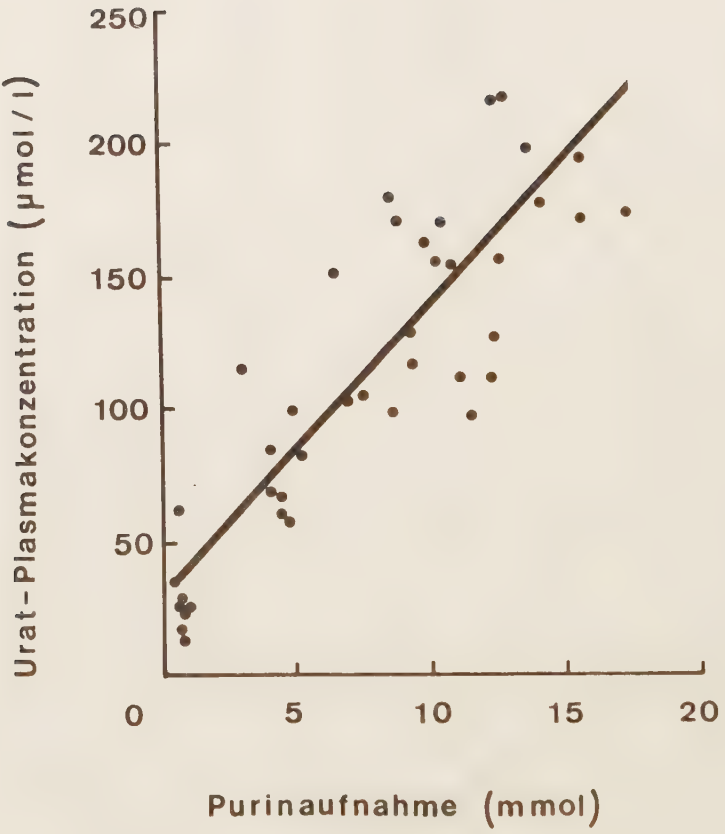



Abbildung 3 : Beziehung zwischen Purinaufnahme (x) und Urat-Plasmakonzentration (y), 5 Stunden nach der Fütterung

$y = 10.78\ x + 31.69$; $r = 0.88$; $n = 40$; $p < 0.001$

gibt sich ferner eine Konzentrationszunahme des Urats von 10.78 µmol/l für jedes aufgenommene mmol Purine. Durch lineare Extrapolation läßt sich die Purinaufnahme ermitteln, die nötig wäre um einen Urat-Plasmaspiegel von etwa 380 µmol/l zu erreichen. Bei diesem Wert würde Urat theoretisch im Plasma auskristallisieren. Dazu wäre eine tägliche Purinaufnahme von etwa 32.4 mmol notwendig. Da Urat zur Bildung übersättigter Lösungen neigt, müßte die Purinaufnahme wahrscheinlich noch höher sein. Die angegebene Purinaufnahme bezieht sich auf 21.7 kg LM.

### 3.1.3. Urat- Ausscheidung im Harn

Zwischen der täglichen Purinaufnahme und der Urat-Ausscheidung im Harn bestand eine lineare Beziehung (Abb. 4). Durch lineare Extrapolation ließ sich die tägliche Urat-Ausscheidung bei vollständig purinfreier Fütterung zu 1.529 mmol ableiten. Dieser Wert ist der Durchschnittswert von allen Hunden, die im Mittel eine Lebendmasse von 21.7 Kilogramm erbrachten. Die mittlere renale Urat-Ausscheidung aus endogener Synthese beträgt demnach 0.07 mmol pro 24 Stunden und kg Lebendmasse. Aus der Regressionsgleichung läßt sich ferner eine Urat-Ausscheidung von 0.412 mmol für jedes mit der Nahrung aufgenommene mmol Purinbasen ermitteln. In Tabelle 7 ist die tägliche Purinaufnahme, die Urat-Ausscheidung absolut und die Urat-Ausscheidung auf Futterverzehr und Lebendmasse bezogen angegeben. Wegen der Verzehrsdepression bei der SCP-100%-Diät steigt die Purinaufnahme zwischen der SCP-75%- und der SCP-100%-Diät nicht weiter an. Aussagekräftig ist demnach vor allem die auf Futterverzehr und Lebendmasse bezogene Urat-Ausscheidung.

### 3.1.4. Allantoinausscheidung im Harn

Zwischen der täglichen Purinaufnahme und der Allantoinausscheidung im Harn bestand eine lineare Beziehung (Abb. 5). Durch lineare Extrapolation läßt sich daraus eine mittlere renale Allantoinausscheidung aus endogener Synthese von 0.077 mmol pro kg Lebendmasse und 24 Stunden ableiten. Für jedes mit der Nahrung zusätzlich aufgenommene mmol Purine ergibt sich aus dem oben beschriebenen Zusammenhang eine zusätzliche Allantoinausscheidung von 0.208 mmol.

Tabelle 7: Tägliche Purinaufnahme, Urat-Ausscheidung absolut und Urat-Ausscheidung auf Futterverzehr und Lebendmasse bezogen (8 Tiere, je 8 Meßtage)

| | Diät | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Casein | SCP-25% | SCP-50% | SCP-75% | SCP-100% |
| Purinaufnahme (mmol) | 0.62 ± 0.09 | 4.37 ± 0.67 | 8.61 ± 1.52 | 12.82 ± 2.77 | 12.34 ± 2.13 |
| Urat-Ausscheidung absolut (mmol) | 2.33 ± 0.53 | 2.91 ± 0.47 | 5.38 ± 1.44 | 6.41 ± 2.28 | 6.61 ± 1.62 |
| Urat-Ausscheidung ($\mu mol.g^{-1}.kg^{-1}$) | 127.95 ± 29.10 | 206.09 ± 33.28 | 357.90 ± 95.74 | 423.10 ± 150.39 | 604.40 ± 148.08 |

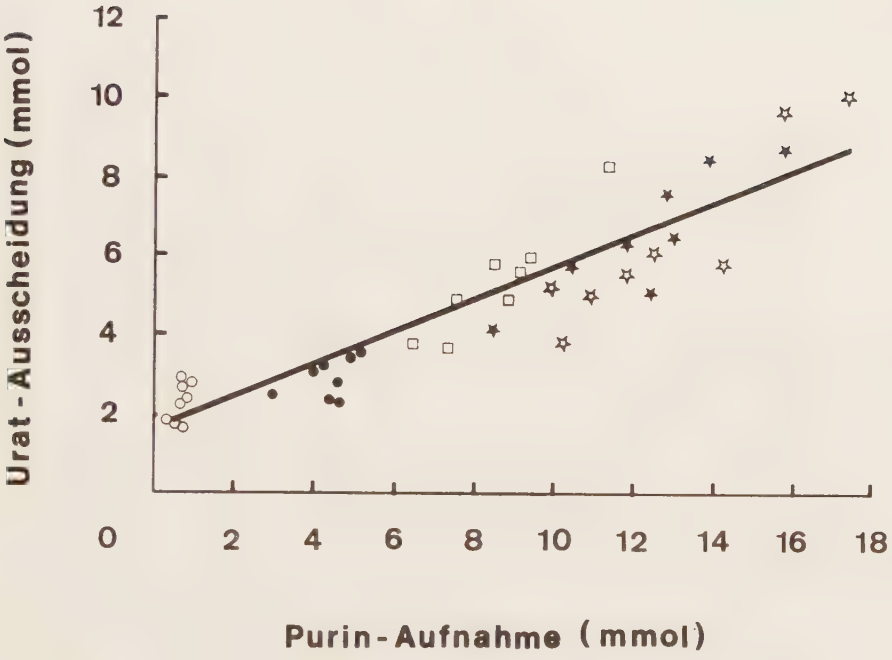



Abbildung 4 : Beziehung zwischen täglicher Purinaufnahme (x) und Urat-Ausscheidung im Harn (y)
$y = 0.412\ x + 1.529$; $r = 0.915$; $n = 40$; $P < 0.001$

○ Casein-Diät, ● SCP-25%-Diät, □ SCP-50%-Diät,
☆ SCP-75%-Diät, ★ SCP-100%-Diät

Tabelle 8: Tägliche Purinaufnahme, Allantoinausscheidung absolut und Allantoinausscheidung bezogen auf Futterverzehr und Lebendmasse (Mittelwerte von 8 Tieren)

| | Diät | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Casein | SCP-25% | SCP-50% | SCP-75% | SCP-100% |
| Purinaufnahme (mmol) | 0.62 ± 0.09 | 4.37 ± 0.67 | 8.61 ± 1.52 | 12.82 ± 2.77 | 12.34 ± 2.13 |
| Allantoin-ausscheidung absolut (mmol) | 2.09 ± 0.36 | 2.45 ± 0.53 | 3.27 ± 0.80 | 4.26 ± 1.24 | 4.44 ± 0.70 |
| Allantoin-ausscheidung ($\mu mol.g^{-1}.kg^{-1}$) | 114.77 ± 19.76 | 173.51 ± 37.53 | 217.60 ± 53.19 | 281.00 ± 81.79 | 406.30 ± 63.98 |

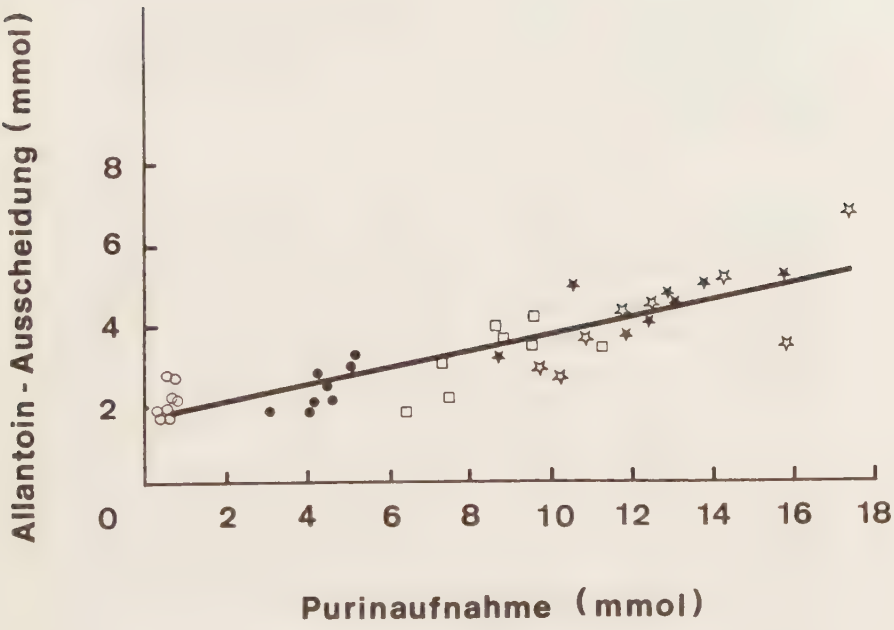



Abbildung 5 : Beziehung zwischen täglicher Purinaufnahme (x) und Allantoin-Ausscheidung (y) im Harn

$y = 0.208\ x + 1.682$; $r = 0.869$; $n = 40$; $p < 0.001$

○Casein-Diät, ●SCP-25%-Diät, □ SCP-50%-Diät,

☆ SCP-75%-Diät, ★SCP-100%-Diät

### 3.1.5. Gesamtpurinausscheidung im Harn

Wie die Tabelle 9 zeigt, steigt das Verhältnis von Urat zu Allantoin bei steigender Purinbelastung zugunsten des Urats zunächst an und erreicht sein Maximum bei der SCP-50%-Diät. Trotz weiter steigender Purinbelastung fällt der Quotient dann aber wieder leicht bis auf etwa 1.5 ab. Dieses Ergebnis soll später diskutiert werden.

In Tabelle 9 fällt auf, daß bei der Casein-Diät die absolute Purinausscheidung etwa 7 mal höher ist als die Purinaufnahme; bei der SCP-25%-Diät immerhin noch etwa 1.2 mal höher. Bei der Betrachtung dieser Zahlen muß man die hohe endogene Synthese von Urat mit berücksichtigen (Abb. 6). Der überwiegende Anteil der Purinausscheidung bei der Casein-Diät stammt aus der endogenen Urat-Synthese. Betrachtet man die SCP-50%-Diät, so könnte der Eindruck entstehen, hier gäbe es keine renale Ausscheidung von Urat aus endogener Synthese mehr, da sich Purinaufnahme und absolute Purinausscheidung in etwa decken. Man muß hier, wie auch bei den entsprechenden Diäten der SCP-75%-Diät sowie der SCP-100%-Diät berücksichtigen, daß nicht alle mit der Nahrung aufgenommenen Purine auch verdaut bzw. resorbiert werden müssen und, daß neben dem renalen auch noch andere Eliminationswege für Urat möglich sind. Später soll darauf noch näher eingegangen werden.

Auch in Tabelle 9 ist der Bezug der Urat-Ausscheidung auf die verzehrte Futtermenge pro kg Lebendmasse wegen der Verzehrsdepression zwischen der SCP-75%- und der SCP-100%-Diät am aussagekräftigsten, auch wenn dies bei der Casein-Diät etwas abwegig zu sein scheint, da hier die Masse der Purinausscheidung aus der endogenen Urat-Synthese stammt und nur bedingt mit der Purinaufnahme zusammenhängt. Die Abbildung 6 zeigt die Regressionsgerade der linearen Beziehung zwischen täglicher Purinaufnahme und Purinausscheidung mit dem Harn. Aus ihr läßt sich durch lineare Extrapolation eine mittlere renale Purinausscheidung aus endogener Synthese von täglich 3.22 mmol bestimmen. Ferner läßt sich daraus ein Anstieg der täglichen Purinausscheidung von 0.62 mmol für jedes zusätzlich mit der Nahrung aufgenommene mmol Purine ableiten.

Tabelle 9: Tägliche Purinaufnahme, Purinausscheidung absolut und Purinausscheidung auf Futterverzehr pro kg Lebendmasse bezogen, sowie molare Urat/Allantoin-Quotienten bei steigender Purinbelastung durch SCP-Diät (Mittelwerte von 8 Tieren)

| | Diät | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Casein | SCP-25% | SCP-50% | SCP-75% | SCP-100% |
| Purinaufnahme (mmol) | 0.62 ± 0.09 | 4.37 ± 0.67 | 8.61 ± 1.52 | 12.82 ± 2.77 | 12.34 ± 2.13 |
| Purinausscheidung absolut (mmol) | 4.42 ± 0.44 | 5.36 ± 0.50 | 8.65 ± 1.12 | 10.67 ± 1.76 | 11.05 ± 1.16 |
| Purinausscheidung ($\mu mol.g^{-1}.kg^{-1}$) | 242.72 ± 24.43 | 379.60 ± 35.40 | 575.50 ± 74.46 | 704.10 ± 116.09 | 1010.70 ± 106.03 |
| molarer Urat/Allantoin-Quotient | 1.10[a] ± 0.15 | 1.22 ± 0.24 | 1.69[b] ± 0.43 | 1.54 ± 0.50 | 1.48 ± 0.24 |

[b] signifikant größer als [a] ($p < 0.05$)

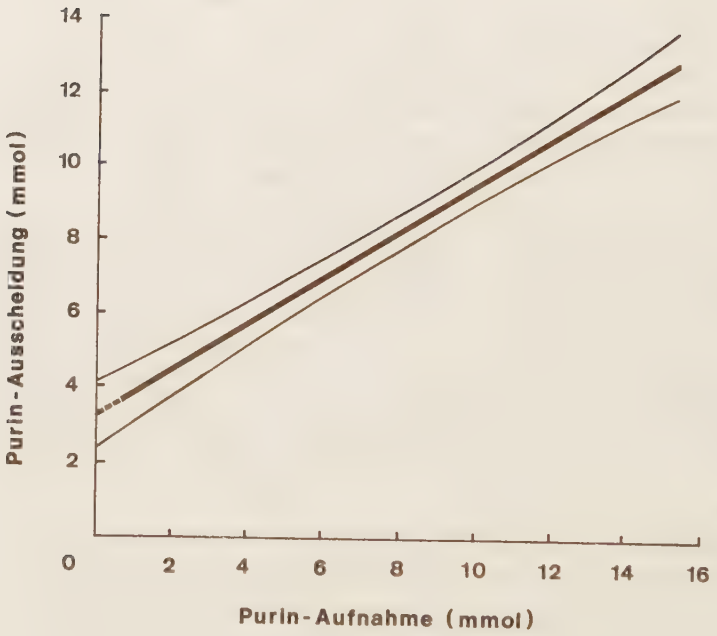



Abbildung 6 : Beziehung zwischen täglicher Purinaufnahme (x) und Purinausscheidung im Harn (y)
$y = 0.621\ x + 3.216$; $r = 0.934$; $n = 40$; $p < 0.001$
(eingezeichnet ist der 95% - Vertrauensbereich)

Von diesen 0.62 mmol werden im Mittel 0.41 mmol oder 66.4% als Urat und 0.21 mmol oder 33.6% als Allantoin ausgeschieden.

Eine Hemmung der endogenen Purinsynthese durch exogene Purinzufuhr hätte eine Abflachung der in Abbildung 6 gezeigten Regressionsgeraden zur Folge haben müssen, die hier nicht festgestellt werden konnte (siehe auch Abb. 4 und 5). Eine zur Purinaufnahme im gesamten gemessenen Bereich proportionale Hemmung wäre allerdings denkbar.

Die Beziehung zwischen täglicher Purinaufnahme und Purinausscheidung über den Harn wurde mit y = 0.621x + 3.216 beschrieben (Abb. 6). Zur Verdeutlichung der teilweise bemerkenswerten individuellen Unterschiede zwischen den Einzeltieren, die ja von 4 verschiedenen Züchtern stammten , also genetisch relativ inhomogen waren, ist die oben beschriebene Beziehung für jedes Tier einzeln in Tabelle 10 angegeben. Zusammengefaßt sind jeweils Geschwisterpaare.

Tabelle 10: Regressionsgleichungen der Beziehung zwischen täglicher Purinaufnahme (x) und Purinausscheidung (y) im Harn für die 8 Einzeltiere (w = weiblich, m = männlich)

| | |
|---|---|
| Hund B, w : | y = 0.648x + 3.823 |
| Hund C, w : | y = 0.614x + 3.459 |
| Hund D, m : | y = 0.458x + 4.110 |
| Hund E, m : | y = 0.546x + 3.881 |
| Hund F, m : | y = 0.714x + 3.191 |
| Hund G, m : | y = 0.624x + 3.600 |
| Hund H, w : | y = 0.478x + 2.940 |
| Hund I, w : | y = 0.493x + 3.235 |
| Durchschnitt aller Hunde: | y = 0.621x + 3.216 |

Zwischen den Geschwisterpaaren zeigen sich teilweise auffällige Unterschiede. So besteht z.B. zwischen den Paaren H + I und F + G ein Unterschied von fast 30% hinsichtlich der Zunahme der Purinausscheidung bei exogener Purinzufuhr. Ähnlich hoch ist der Unterschied in der endogenen Purinsynthese zwischen den Paaren D + E und H + I. Interessant ist, daß sich ein Zusammenhang zwischen dem nur subjektiv feststellbaren Temperament dieser Hunde und der endogenen Purinsynthese herstellen ließe. Die auffallend agilen Hunde H + I zeigen hier die niedrigsten Werte, die ruhigsten Hunde D + E die höchsten Werte.

Die Abbildung 7 zeigt die Urat- und Allantoin-Ausscheidung bezogen auf Futterverzehr pro kg Lebendmasse bei den 5 Diäten. Die relativ großen Streuungen fallen dabei auf. Deshalb sind an dieser Stelle die individuellen Unterschiede der Tiere zu erwähnen, die hier wohl maßgeblich die Streuung beeinflussen. Betrachtet man unabhängig von den Mittelwerten der Behandlungsgruppen (Tab. 9) die individuellen Urat/Allantoin-Quotienten, so fallen die hohen Unterschiede zwischen den Einzeltieren auf.

Tabelle 11: Urat/Allantoin-Quotienten der 8 Einzeltiere bei den verschiedenen Diäten

| Hund | Diäten | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Casein | SCP-25% | SCP-50% | SCP-75% | SCP-100% |
| B | 1.34 | 1.58 | 2.35 | 2.72 | 1.67 |
| C | 1.09 | 1.19 | 1.35 | 1.13 | 1.60 |
| D | 1.15 | 0.99 | 1.17 | 1.65 | 1.42 |
| E | 1.20 | 1.55 | 1.65 | 1.35 | 1.77 |
| F | 1.03 | 0.96 | 2.15 | 1.52 | 1.73 |
| G | 1.04 | 1.04 | 1.46 | 1.25 | 1.13 |
| H | 0.84 | 1.15 | 1.38 | 1.38 | 1.24 |
| I | 1.18 | 1.26 | 2.04 | 1.30 | 1.28 |

Im Gegensatz zu den in Tabelle 10 angegebenen Daten spielt der Verwandtschaftsgrad hier offenbar keine Rolle.

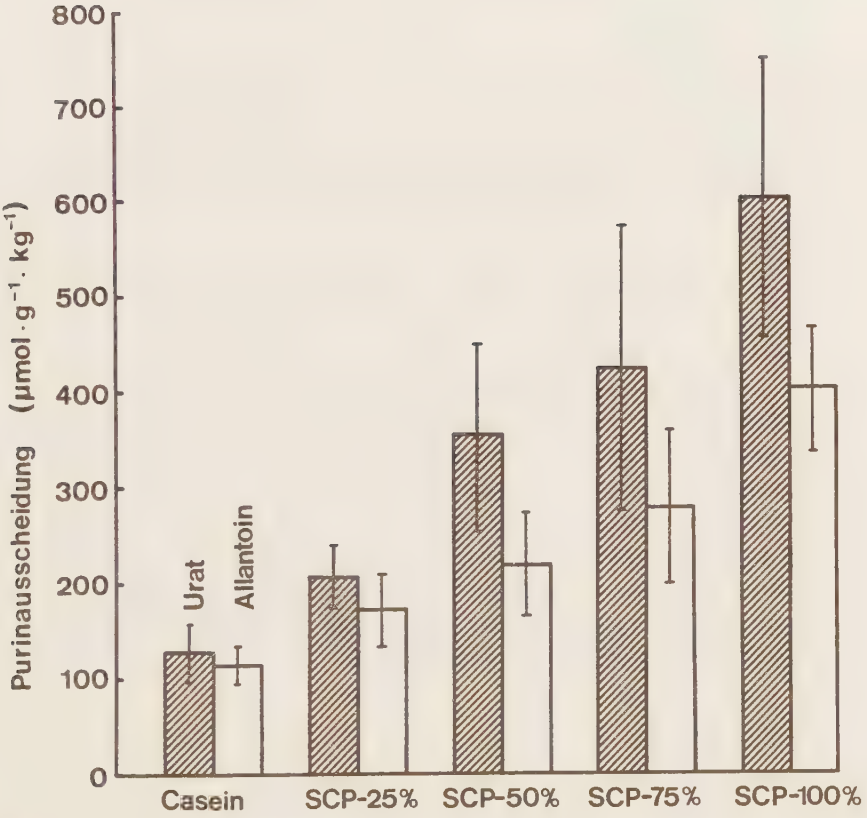



Abbildung 7 : Urat-und Allantoin-Ausscheidung bezogen auf Futterverzehr pro kg Lebendmasse bei den 5 Diäten

## 3.2. Einfluß der Qualität nutritiver Nucleinsäuren auf den Purin-Stoffwechsel

Bei diesem Versuch wurden 2, in etwa purinäquivalente Diäten angewandt, die sich in der Qualität ihrer Nucleinsäuren unterschieden. Nucleinsäurenträger bei der sogenannten RNA-Diät war eine RNA aus Hefe, und bei der sogenannten SCP-100%-Diät ein Bakterien-Einzellerprotein (SCP).

### 3.2.1. Futter- und Wasseraufnahme, Harnvolumen, Harnkonzentration

Die Tabelle 12 gibt die Daten zur Futter- und Wasseraufnahme sowie die Harndaten wieder. Beim Vergleich mit der Tabelle 4 fällt der unterschiedliche Futterverzehr bei den beiden SCP-100%-Diäten auf. Das für die in Kapitel 3.2. beschriebenen Versuche verwendete Single-Cell-Protein FM-181 wurde in granulierter Form geliefert. Daneben unterschied es sich offenbar auch in Geschmack und Geruch von dem relativ staubigen, etwas unangenehm riechenden SCP U130, das in den vorhergehenden Versuchen zur Verwendung kam. Die erwähnten Unterschiede im Verzehr sind wahrscheinlich auf Unterschiede in der Konsistenz, im Geschmack und auch im Geruch zurückzuführen.

Tabelle 12: Futter- und Wasseraufnahme, Harnvolumen und Urat-Konzentration im Harn, Vergleich der 3 Diäten (Mittelwert von 6 Tieren und jeweils 7 Meßtagen)

| Diät | Futter-aufnahme (g/kg LM) | Wasser-aufnahme (ml/kg LM) | Harn-volumen (ml/kg LM) | Urat im Harn (mmol/l) |
|---|---|---|---|---|
| Casein-Diät | 18.94 ± 3.93 | 42.68 ±13.53 | 31.10 ±14.57 | 3.11 ±1.06 |
| RNA-Diät | 17.65 ± 3.17 | 42.54 ± 9.73 | 30.56 ± 9.60 | 6.10 ±2.17 |
| SCP-100%-Diät (mit SCP FM-181) | 15.38 ± 2.00 | 46.16 ± 9.64 | 34.90 ±14.59 | 7.86 ±2.73 |

3.2.2. Uratplasmaspiegel nach der Fütterung

Plasmaproben wurden kurz vor, bzw. 2.5, 5, 7.5, und 10 Stunden nach der Fütterung gewonnen, um den Verlauf des Urat-Plasmaspiegels nach der Aufnahme von 2 verschiedenen Nucleinsäurequalitäten zu beobachten.

Tabelle 13: Urat-Konzentration im Plasma nach Fütterung der verschiedenen Diäten

| Diät | Urat-Konzentration im Plasma (µmol/l) — Zeit nach Fütterung (h) | | | | | n |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 2.5 | 5 | 7.5 | 10 | |
| Casein-Diät | 50.47 ± 7.11 | 38.47 ± 5.42 | 30.94 ± 10.21 | 38.54 ± 9.72 | 30.42 ± 5.98 | 6 |
| RNA-Diät[a] | 55.81 ± 11.73 | 84.95[c] ± 15.52 | 98.08[c] ± 13.23 | 99.96[c] ± 10.00 | 94.92[c] ± 7.80 | 6 |
| SCP-100%-Diät[b] (mit SCP-FM 181) | 55.28 ± 13.56 | 111.97[d] ± 15.59 | 146.48[d] ± 33.05 | 138.23[d] ± 13.71 | 110.86[d] ± 13.25 | 6 |

[a] Puringehalt in der RNA-Diät: 51.42 mmol/kg

[b] Puringehalt in der SCP-100%-Diät: 53.9 mmol/kg

[c] signifikant kleiner als [d] ($P<0.05$)

Die Abbildung 8 zeigt den Verlauf der Urat-Plasmakonzentration in Abhängigkeit vom Fütterungszeitpunkt für die Kontroll-Casein-Diät und die beiden nahezu purinäquivalenten Nucleinsäurendiäten. Auffallend ist die Höhe und der Verlauf der Urat-Plasmakonzentration bei Verabreichung der RNA-Diät. Die nach 2.5, 5, 7.5 und 10 Stunden gemessenen Werte liegen signifikant unter den mit der SCP-100%-Diät erhaltenen Spiegeln. Aus den Versuchen mit steigender nutritiver Purinbelastung bei gleicher Nucleinsäurenqualität (3.1.) ergab sich eine deutliche Abhängigkeit des Plasma-Uratspiegels von der aufgenommenen Purinmenge. Offenbar übt aber auch die Qualität der aufgenommenen Nucleinsäuren einen erheblichen Einfluß auf die Uratspiegel im Plasma aus. An späterer Stelle soll darauf noch näher eingegangen werden. Dort soll auch eine Erklärung für den auffallenden Unterschied in Verlauf und Höhe der Plasma-Uratkonzentrationen nach der Futteraufnahme bei den unterschiedlichen SCP-100%-Diäten (3.1. und 3.2.) versucht werden (Abb. 2 und 8).

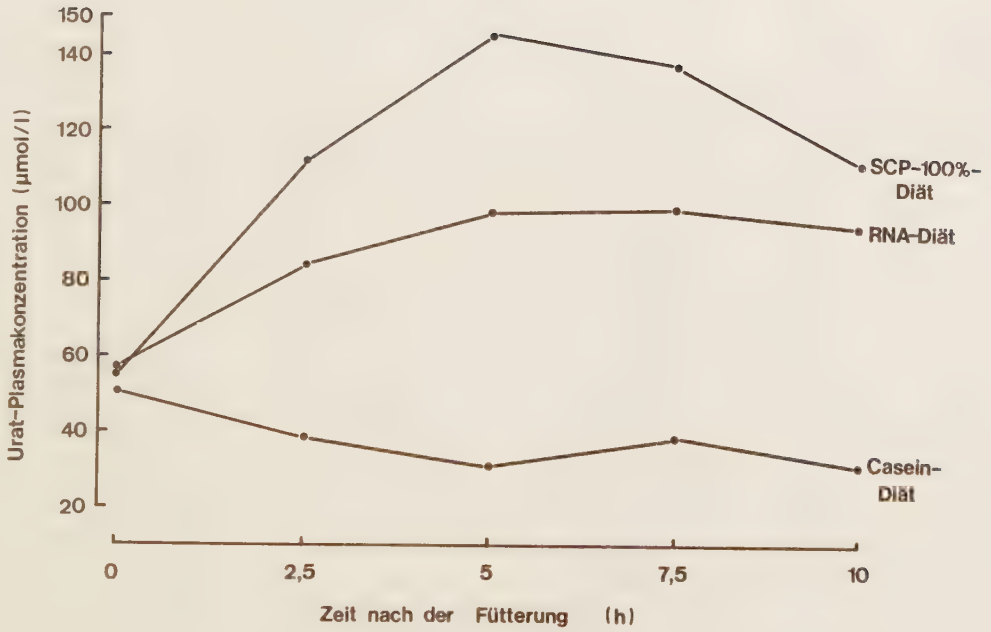



Abbildung 8 : Verlauf der Urat-Plasmakonzentration nach der Fütterung

Tabelle 14: Tägliche Purinaufnahme, Urat-Ausscheidung absolut, bezogen auf Futterverzehr und Lebendmasse und bezogen auf aufgenommene Purinbasen und Lebendmasse (6 Tiere, je 7 Meßtage)

| | Casein-Diät | RNA-Diät | SCP-100%-Diät (mit SCP FM-181) |
|---|---|---|---|
| Purin-aufnahme (mmol) | 0.64 ± 0.13 | 19.95 ± 3.57 (109%) | 18.21 ± 2.37 (100%) |
| Urat-Ausscheidung absolut (mmol) | 2.26 ± 1.48 | 4.26[a] ± 1.88 (73%) | 5.80[b] ± 2.52 (100%) |
| Urat-Ausscheidung ($\mu mol.g^{-1}.kg^{-1}$) | 119.57 ± 78.30 | 241.63[a] ± 106.63 (64%) | 377.60[b] ± 164.06 (100%) |
| Urat-Ausscheidung ($mmol.mmol^{-1}.kg^{-1}$) | 77.13 ± 50.51 | 4.69[a] ± 2.07 (67%) | 7.00[b] ± 3.04 (100%) |

a signifikant kleiner als b ($P<0.05$)

3.2.3. Urat-Ausscheidung im Harn

Wie die Tabelle 14 zeigt, ergab sich trotz der höheren Purinaufnahme für die RNA-Diät im Vergleich zur in etwa purinäquivalenten SCP-100%-Diät eine um 36% geringere Urat-Ausscheidung (bezogen auf Futterverzehr pro kg LM). Da die beiden Diäten nicht völlig purinäquivalent waren, bezieht man die Urat-Ausscheidung besser auf die aufgenommenen Purine pro kg Lebendmasse. Es bleibt ein Unterschied von 33% (SCP-100%-Diät = 100%, RNA-Diät = 67%). Die hohe Urat-Ausscheidung bei der Casein-Diät mit 77.13 fällt bei dieser Darstellung auf. Bezieht man die ausgeschiedene Uratmenge auf die pro kg Lebendmasse verzehrten Purinbasen, so fällt bei der purinarmen Casein-Diät der Anteil des aus endogener Produktion stammenden Urates im Harn besonders ins Gewicht.

## 3.3. Stoffwechselkinetik und Elimination von Purinmetaboliten bei unterschiedlicher Purinaufnahme

Zur Quantifizierung der Stoffwechselflüsse der Purinmetaboliten Urat und Allantoin wurde ein Infusionsversuch mit (2-$^{14}$C)Urat vorgenommen. Die Messungen erfolgten im Fließgleichgewicht.

### 3.3.1. Turnover von Urat und Allantoin

Bei einem konstanten Dosisstrom von $^{14}$C-Urat stellte sich bei allen 4 Hunden ein Fließgleichgewicht für Urat und Allantoin nach etwa 4 - 5 Stunden ein. Die Abbildung 9 zeigt den Verlauf der Spezifischen Aktivitäten für Urat und Allantoin im Plasma bei hoher und geringer nutritiver Purinbelastung d. h. nach Fütterung mit SCP-100%-Diät bzw. Casein-Diät. Der prinzipiell verschiedene Verlauf der Spezifischen Aktivität im Plasma wird anhand dieser Kurven deutlich. Bei hoher nutritiver Purinbelastung tritt nach der Fütterung eine ständige Verdünnung des per Dauerinfusion zufließenden markierten Urats ein, so daß sich in der Phase des "steady state" bei einem hohen Plasmaspiegel von Urat und Allantoin die Spezifische Aktivität für diese Substanzen auf einem niedrigen Niveau bewegt. Umgekehrt liegen die Verhältnisse bei geringer nutritiver Purinbelastung; hier steigt die Spezifische Aktivität im

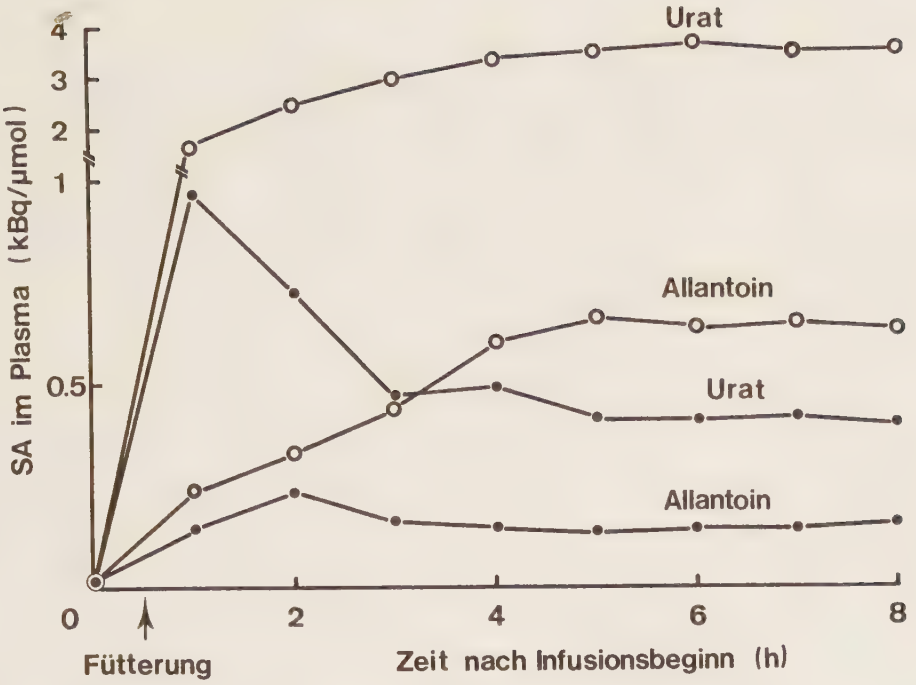



Abbildung 9 : Verlauf der Spezifischen Aktivität (SA) von Urat und Allantoin im Plasma bei hoher (●) und geringer (○) Purinbelastung (Der Maßstab auf der Ordinate wurde hier unterbrochen, da es bei dieser Darstellung weniger auf die absolute Höhe, sondern vielmehr auf den Verlauf der angegebenen Kurven ankommt.)

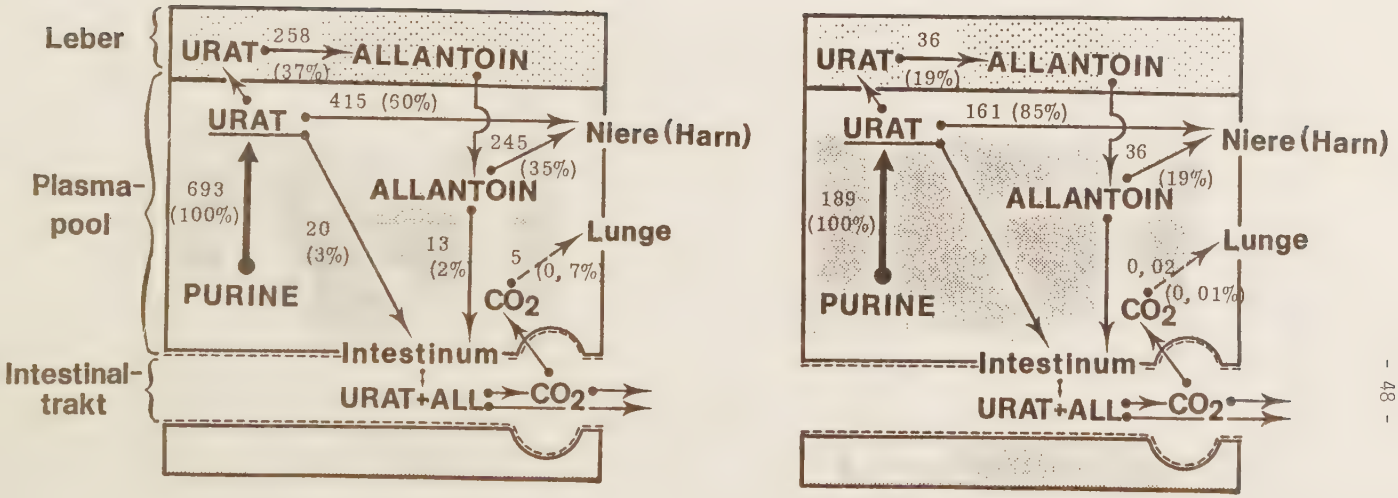
Plasma bis zur Plateauphase ständig an, da sich die Plasmaspiegel nach der Fütterung kaum verändern. Ein Fließgleichgewicht stellte sich nach 4 - 5 Stunden ein; zur Ermittlung der in Tabelle 11 angegebenen Daten wurden alle zwischen der 5. Stunde nach Infusionsbeginn und dem Versuchsende gewonnenen Proben zur Analyse verwendet. Die Tabelle 11 zeigt die wichtigsten stoffwechselkinetischen Daten, die sich aus der Bestimmung der Spezifischen Aktivität für Urat und Allantoin im Plasma und im Harn sowie aus den exhalationsradiometrischen Messungen ergaben.

### 3.3.2. Eliminationswege für Urat und Allantoin

Aus den in Tabelle 15 wiedergegebenen stoffwechselkinetischen Daten werden die Stoffwechsel-Flüsse im Fließgleichgewicht ("steady state") abgeleitet und die bei hoher und niedriger exogener Purinbelastung erhaltenen Werte in Abbildung 10 schematisch dargestellt. Obwohl entsprechend dem Infusionsmodell ein Ein-Kompartiment-Modell angenommen wurde, ist die Leber als Organ der Transformation von Urat in Allantoin besonders hervorgehoben, ebenso der Gastrointestinaltrakt als Organ der Urat- und Allantoin-Transformation zu $CO_2$. Die angegebenen Flüsse beziehen sich auf den vasalen Raum bzw. wurden aus den zugehörigen Messungen berechnet. Es zeigte sich (Abb. 10), daß die Eliminationswege für das aus dem Pool abfließende Urat bei hoher und geringer nutritiver Purinbelastung quantitativ differieren. Während bei hoher Belastung 37% des Urats in Allantoin umgewandelt werden, sinkt dieser Anteil bei geringer Purinbelastung auf 19%. Der Haupteliminationsweg für Urat ist in beiden Fällen die Ausscheidung über den Harn, in dem bis zu 85% des Urat-Turnovers wiedergefunden werden konnten (Abb. 10). Bei hoher Purinbelastung und hohem Uratspiegel sinkt dieser Anteil am Turnover wegen des höheren Transferquotienten (Umwandlung von Urat in Allantoin) auf 60%. Die Resekretion in den Gastrointestinaltrakt mit anschließender bakterieller Purinolyse spielt offenbar nur bei einem hohen Urat-Plasmaspiegel eine, wenn auch nur bescheidene Rolle. Von den berechneten 3% für Urat und 2% für Allantoin (jeweils auf die Eintrittsrate von Urat bezogen), fand sich nur ein geringer Anteil von 0.7% (ebenfalls bezogen auf den Urat-Turnover) als $CO_2$ in der Expirationsluft wieder. Bei geringer Purin-

Tabelle 15: Stoffwechselkinetische Daten
(Spezifische Aktivität (SA), Transferquotient (Tfq), Infusionsrate, Turnover (To), Harnwerte)

| | Hohe nutritive Purinbelastung (SCP-100%-Diät) | Geringe nutritive Purinbelastung (Casein-Diät) |
|---|---|---|
| SA im Plasma (Bq/µmol) | | |
| für Urat | 378.2 | 3552.0 |
| für Allantoin | 140.8 | 678.0 |
| Tfq für Urat in Allantoin ($= \frac{\text{SA All.}}{\text{SA Urat}} \cdot 100$) | 37.2% | 19.1% |
| Infusionsrate ($Bq.kg^{-1}.min.^{-1}$) | 262.1 | 672.0 |
| To ($nmol.kg^{-1}.min^{-1}$) | | |
| für Urat ($= \frac{\text{Infusionsrate}}{\text{SA}}$) | 692.7 | 189.2 |
| für Allantoin ($= \frac{\text{To Urat.Tfq}}{100}$) | 257.7 | 36.1 |
| Exhalation als $^{14}CO_2$ ($Bq.kg^{-1}.min^{-1}$) | 1.30 | 0.064 |
| Harnproduktion ($\mu l.kg^{-1}.min^{-1}$) | 24.6 | 19.8 |
| Elimination über den Harn ($nmol.kg^{-1}.min^{-1}$) | | |
| Urat | 414.9 (59.9% des To) | 161.2 (85.2% des To) |
| Allantoin | 244.8 (95.0% des To) | 36.1 (100.0% des To) |
| SA im Harn (Bq/ µmol) | | |
| für Urat | 398.5 | 3710.7 |
| für Allantoin | 143.6 | 782.9 |




**hohe nutritive Purinbelastung**
**SCP–100%–Diät**

**geringe nutritive Purinbelastung**
**Casein–Diät**

Abbildung 10 : Stoffwechselflüsse (nmol.kg$^{-1}$.min$^{-1}$) von Urat und Allantoin bei hoher und geringer nutritiver Purinbelastung (Prozentangaben beziehen sich auf den Urat-Turnover, der = 100% gesetzt wurde, All. = Abkürzung von Allantoin, die gestrichelte Linie soll andeuten, daß nicht 100% des resorbierten $CO_2$ exhaliert werden)

belastung und damit geringem Urat-Plasmaspiegel ist der als $CO_2$ meßbare Anteil vernachläßigbar klein. Es ist nicht bekannt, welcher Anteil des entstehenden $CO_2$ reabsorbiert wird, ebenso ist auch nicht bekannt in welchem Ausmaß resekretierte Purinkörper im Dickdarm durch bakterielle Enzyme zersetzt werden. Bei hoher nutritiver Purinbelastung wurden 95% des entstehenden Allantoins renal eliminiert, bei geringer Purinbelastung konnten sogar 100% des entstandenen Allantoins im Harn wiedergefunden werden. Bei der Casein-Diät wurde eine Urat-Eintrittsrate (Abb. 10) von 189 $nmol.kg^{-1}.min^{-1}$ ermittelt. Davon wurden 36 nmol (= 19%) in Allantoin umgewandelt und 161 nmol (= 85%) renal eliminiert. Die so entstehenden 104% sind durch die Streuung der Bestimmungsmethode zu erklären. Bedingt durch die relativ geringen Stoffwechselflüsse bei niedrigen Plasma-Uratspiegeln (Casein-Diät) macht sich die Streuung der HPLC-Bestimmungsmethode für Allantoin besonders bemerkbar (Kap. 2.5.2.).

# 4. DISKUSSION

## 4.1. Metabolisierung und Elimination von Purinmetaboliten

Aus den Ergebnissen der im Fließgleichgewicht erfolgten Messungen lassen sich keine Schlüsse über den Verteilungsraum von Urat oder Allantoin ziehen. Der Verteilungsraum für Urat wird von BIANCHI et al. (1979) für den Menschen mit etwa 33% des Körpervolumens angegeben. Er folgerte dies aus Einzelinjektionsversuchen mit $^{14}$C-Urat. Ähnliche Versuche ließen sich beim Dalmatiner wahrscheinlich nur unter gleichzeitiger Uricasehemmung (z. B. durch Oxonate) durchführen. Für den Hund oder speziell den Dalmatiner liegen Angaben zum Verteilungsraum bisher nicht vor. Nimmt man den Verteilungsraum für Urat auch beim Dalmatiner mit 33% des Körpervolumens an, so ließen sich die bisherigen stoffwechselkinetischen Daten mit Hilfe der aktuellen Plasmakonzentration für Urat und Allantoin im Fleißgleichgewicht erweitern. Wegen des im Vergleich zum Dalmatiner wesentlich höheren Plasma-Uratspiegels beim Menschen, ist die Annahme dieser 33% für den Dalmatiner nur unter der Voraussetzung zulässig, daß die Größe des Urat-Verteilungsraumes nicht maßgeblich von der Höhe des Plasma-Uratspiegels beeinflußt wird. Angaben über den Verteilungsraum für Allantoin fehlen bisher völlig. Er wurde deshalb ebenfalls mit 33% des Körpervolumens angenommen. Aus der momentanen Poolgröße (Verteilungsraum x Konzentration im Verteilungsraum), läßt sich dann die Turnoverrate (Transferkonstante) k und die Turnoverzeit (Transferzeit) $\frac{1}{k}$ ableiten. Die Tabelle 16 gibt diese zusätzlichen Daten wieder. Die Turnoverrate k gibt den Teil des Pools an, der pro Zeiteinheit beseitigt bzw. ersetzt wird. Die Turnoverzeit $\frac{1}{k}$ gibt die Zeit an, die benötigt wird, um den gesamten Pool einmal zu erneuern. Für den Menschen wird ein k für Urat von etwa 0.0004 ($min^{-1}$) beschrieben (SCOTT et al., 1969, SØRENSEN, 1960). Dieser Wert ergibt sich aus einem Turnover von etwa 40($nmol.kg^{-1}.min^{-1}$) und einer Poolgröße von etwa 105(µmol/kg).

Vergleicht man diese Werte mit den vom Dalmatiner gewonnenen, so fällt der wesentlich größere Urat-Pool des Menschen auf, der auf den viel

Tabelle 16: Zusätzlich berechnete stoffwechselkinetische Daten

| | Hohe nutritive Purinbelastung (SCP-100%-Diät) | Geringe nutritive Purinbelastung (Casein-Diät) |
|---|---|---|
| Plasmakonzentrationen im steady state (µmol/l) | | |
| für Urat | 114.2 | 36.5 |
| für Allantoin | 88.4 | 25.4 |
| Poolgröße (Pl, µmol/kg) im steady state | | |
| für Urat | 37.7 | 12.0 |
| für Allantoin | 29.1 | 8.4 |
| Gesamtaktivität (kBq/kg) im Urat- + Allantoin Pool | 18.35 | 48.32 |
| Exhalation als $^{14}CO_2$ ($Bq.kg^{-1}.min^{-1}$) | 1.30 | 0.064 |
| $\frac{\text{Exhalation als } ^{14}CO_2}{\text{Gesamtaktivität im Urat- + All.Pool}} \cdot 100$ | 0.007% | 0.0001% |
| Turnoverrate ($k = \frac{To^{x)}}{Pl}$; $min^{-1}$) | | |
| für Urat | 0.0184 | 0.0158 |
| für Allantoin | 0.0089 | 0.0043 |
| Turnoverzeit ($\frac{1}{k}$; min) | | |
| für Urat | 54.3 | 63.3 |
| für Allantoin | 112.3 | 232.6 |

x) To = Turnover

höheren Urat-Plasmaspiegel zurückzuführen ist. Dieser wird heute durchschnittlich mit etwa 300 µmol/l angegeben (MERTZ, 1973). Weiter fällt der wesentlich geringere Urat-Turnover des Menschen auf. Selbst bei extrem geringer Purinbelastung ließ sich beim Dalmatiner ein im Vergleich zum Menschen fast 4 mal größerer Urat-Turnover messen. Im Gegensatz zum Menschen wird beim Dalmatiner renal filtriertes Urat kaum rückresorbiert und es wird dadurch wesentlich rascher ausgeschieden als beim Menschen. Aus den Versuchen mit steigender exogener Purinzufuhr konnte eine mittlere renale Purinausscheidung aus endogener Synthese von 3.22 mmol pro Hund (Durchschnittsgewicht 21.7 kg) in 24 h errechnet werden. Den vergleichbaren Wert für den Menschen geben WASLIEN et al.(1970) mit etwa 2.4 mmol an. Zum Vergleich dieser Zahlen muß berücksichtigt werden, daß der Mensch, abhängig von der Höhe des Urat-Plasmaspiegels, erhebliche Mengen Urat über den Verdauungskanal eliminiert. SØRENSEN (1960) konnte bei i.v. $^{14}$C-Urat-Infusionsversuchen nur etwa 70 - 75 % der infundierten Aktivität im Harn wiederfinden. Bei hohem Urat-Plasmaspiegel wurden beim Dalmatiner rechnerisch insgesamt etwa 5% des Urat-Turnovers in den Gastrointestinaltrakt resekretiert. Bei niedrigem Plasmaspiegel war rechnerisch kein derartiger Urat- oder Allantoin-Fluß festzustellen. Als $^{14}CO_2$ konnten jedoch im ersten Fall nur 0.7%, im 2. Fall sogar nur 0.01% (jeweils bezogen auf den Urat-Turnover) gemessen werden (Abb. 10). Eine 100%ige Wiederfindung war allerdings auch nicht zu erwarten, da von einer vollständigen Resorption des entstandenen $CO_2$ sowie von einer vollständigen Purinolyse nicht auszugehen war. Offensichtlich hat beim Dalmatiner die Höhe des Urat-Plasmaspiegels einen erheblichen Einfluß auf die Menge der in den Gastrointestinaltrakt abfließenden Purinmetaboliten, da bei hohen Spiegeln etwa 70 mal mehr durch bakterielle Purinolyse entstandenes $CO_2$ als bei niedrigen Plasmaspiegeln gefunden werden konnte. Der für den Menschen angegebene Wert von etwa 2.4 mmol für die renale Urat-Ausscheidung aus endogener Synthese muß also noch um den in den Verdauungskanal resezernierten Anteil erweitert werden. Die tägliche endogene Uratsynthese des Menschen beträgt demnach etwa 3.0-3.1 mmol. Bezogen auf das Körpergewicht ergibt sich für die tägliche endogene Purinsynthese des Dalmatiner-Hundes etwa das 3-fache des für den Menschen angegebenen Wertes.

Diese hohe endogene Purinsynthese ließe sich mit einer im Vergleich zum Menschen geringeren Aktivität der Enzyme Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) oder Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT) erklären. Diese Enzyme bilden aus Hypoxanthin, Guanin und Adenin die Purinnucleotide GMP, IMP und AMP, die durch einen negativen feed-back-Mechanismus die Purin-de-novo-Synthese beeinflussen (MERTZ, 1975). Die Frage ob diese im Vergleich zum Menschen hohe endogene Purinsynthese dem Dalmatiner oder der Spezies Hund eigentümlich ist, läßt sich nicht klar beantworten. YÜ et al. (1971) stellten zwar bei Dalmatiner-und Nicht-Dalmatiner-Hund in etwa die gleiche Gesamtpurinausscheidung (Urat + Allantoin) fest; da aber nichts über die Purinaufnahme während der Messungen berichtet wird, ist die Angabe von ca. 4 mmol Purine in 24 h bezüglich der obigen Frage nur bedingt zu gebrauchen. Nach diesen Untersuchungen schied der Nicht-Dalmatiner etwa 14 mal mehr Allantoin wie Urat aus.

Bei zunehmender alimentärer Purinbelastung zwischen 0.62 und 12.34 mmol Purinbasen täglich erhöhte sich der molare Urat/Allantoin-Quotient im Harn von 1.1 bei der purinarmen Casein-Diät bis zum Maximalwert von 1.69 bei der SCP-50%-Diät. Bei weiterer Purinbelastung fiel dieser Quotient dann wieder leicht ab (Tab.9). Betrachtet man die Regressionsgleichungen der Beziehungen zwischen der täglichen Purinaufnahme und der Urat-Ausscheidung im Harn sowie der Allantoin-Ausscheidung im Harn (Abb. 4 und Abb. 5), so läßt sich feststellen, daß die Steigung der Regressionsgeraden bei der Urat-Ausscheidung mit 0.41 fast doppelt so groß war wie die Steigung der Regressionsgeraden zwischen der Purinaufnahme und der Allantoin-Ausscheidung im Harn. Für jedes zusätzlich aufgenommene mmol Purine steigt also die Urat-Ausscheidung fast doppelt so stark an wie die Allantoin-Ausscheidung. MAIER (1979) hatte bei steigender Purinzufuhr auch steigende Urat/Allantoin-Quotienten gefunden und er deutete dies als einen Hinweis auf eine Limitierung der Umsetzung von Urat in Allantoin durch eine ungenügende Aktivität der Uricase. Die eigenen Ergebnisse lassen zumindest den Schluß zu, daß unter der Voraussetzung der Gültigkeit einer linearen Beziehung zwischen Purinaufnahme und Urat- bzw. Allantoin-Ausscheidung die Umwandlung von Urat in Allantoin nicht Schritt halten kann mit dem steigenden Angebot von Urat aus Nahrungspurinen. Ob ursächlich dabei mehr eine mangelnde Aktivität von

Uricase oder ein Transportdefekt der Leberzellmembran im Vordergrund steht, läßt sich durch die durchgeführten Versuche nicht entscheiden und war auch nicht primär Ziel dieser Arbeit. Weitere in vitro Untersuchungen an Leberschnitten von Dalmatinerhunden könnten diese Fragen eventuell klären helfen. Im Gegensatz zu AFZELIUS (1965), der beim Dalmatiner mangelnde Uricaseaktivität vermutete, hatten ANDREINI et al. (1966) durch vergleichende Untersuchungen an Leberhomogenaten von Hunden verschiedener Rassen die Uricaseaktivität des Dalmatiners als ähnlich hoch wie die des Nicht-Dalmatiners bestimmt und deshalb als Ursache für die Stoffwechselanomalie im Purinstoffwechsel des Dalmatiners einen Urat-Transportdefekt angenommen. Über den Transport von Urat und anderen Purinmetaboliten ist insgesamt wenig bekannt. Am besten wurde diesbezüglich die Niere untersucht. Hier konnte ein aktiver Transport für Urat im Nierentubulus des Menschen nachgewiesen werden (SØRENSEN und LEVINSON, 1975). BERLIN und HAWKINS (1968) konnten beim Hamster einen aktiven Transportmechanismus nachweisen, der Urat in das Darmlumen des Dünndarmes resezerniert; die Existenz eines solchen Mechanismus konnten von KHAN et al. (1975) jedoch nicht bestätigt werden. Umgekehrt, also vom Darmlumen in die Mucosazelle des Darmes gelangt Urat durch passive Diffusion. Dies konnten OH et al. (1967) für den Dünndarm der Ratte nachweisen. Wie Urat in die Leberzelle bzw. in die Peroxysomen der Leberzelle gelangt ist bisher unbekannt. LASSEN (1961) beobachtete an Erythrozyten des Menschen, daß Urat bei geringer Uratkonzentration des Mediums per Diffusion in den Erythrozyten gelangt. Bei höheren Uratkonzentrationen konnte LASSEN ein in seiner Kapazität begrenztes Transportsystem für Urat nachweisen. HARVEY und CHRISTENSEN (1964) konnten bei Erythrozyten von Nicht-Dalmatinern eine ausgeprägte Hemmung des transmembranösen Urat-Transports durch Hypoxanthin erreichen. Beim Dalmatiner konnten sie eine derartige Transportinhibition an der Erythrozytenmembran nicht feststellen. Durch diese Versuche gelangten sie zu der Vermutung, daß beim Dalmatiner-Hund ein generalisierter Transportdefekt für Urat vorliegen könnte. YÜ et al. (1971) griffen diese Vermutung auf und versuchten sie durch eigene Studien zu untermauern. YÜ et al. behandelten Nicht-Dalmatiner mit Oxonat, einem Uricaseinhibitor, und erreichten dadurch ähnlich hohe Urat-Ausscheidungen wie sie beim Dalmatiner gemessen wurden. Durch diese Versuche und durch die Betrachtung der bisher bekannten Untersuchungen am Dalmatiner kamen auch YÜ et al. zu dem Schluß, daß ein genetisch fixierter Transportdefekt die Ursache für die Besonderheit im Purinstoffwechsel sein müsse. Ein Transportdefekt, der das Urat in ungenügender Weise zur Uricase gelangen läßt.

## 4.2. Metabolische Verfügbarkeit von Nahrungspurinen

In zwei verschiedenen Versuchen wurde einmal der Einfluß von qualitativ gleichen Nucleinsäuren und zum anderen der Einfluß der Nucleinsäurenqualität auf den Purinstoffwechsel untersucht. Wie sich aus Abbildung 6 ableiten läßt, wurden nur etwa 62% der aufgenommenen Purine im Harn als Urat und Allantoin wiedergefunden. Die stoffwechselkinetischen Messungen an Dalmatinern ergaben, daß selbst bei sehr hoher Purinbelastung nur relativ wenig Purinmetaboliten extrarenal beseitigt werden. Für die folgenden Überlegungen soll deshalb die Messung der Purinausscheidung im Harn als genügend genaues Maß für die Gesamtpurinausscheidung angenommen werden. Die aufgenommenen Nucleinsäuren, die im Falle der SCP-Diäten in Form von Nucleoproteinen vorliegen, werden vorwiegend im Dünndarm verdaut, wo auch die Spaltung der Nucleoproteine in ihren Protein- und Nucleinsäurenanteil stattfindet. Durch Einwirkung verschiedener Nucleasen aus dem Pankreas und den Mucosazellen kommt es im weiteren Verlauf der Verdauung zu einer intraluminären enzymatischen Hydrolyse der Polynucleotidketten in Oligonucleotide. Phosphodiesterasen aus der intestinalen Mucosa hydrolysieren, vermutlich an der Zelloberfläche, die Oligonucleotide zu Mononucleotiden, die dann ihrerseits durch Phosphatasen der Mucosazellen zu den Purin- oder Pyrimidinnucleosiden gespalten werden. Die so entstandenen Nucleoside werden absorbiert. Intrazellulär findet dann eine phosphorolytische Aufspaltung in die freie Base und Ribose-1-phosphat statt (GRIEBSCH und KAISER, 1976). Vom Menschen ist eine hohe Xanthinoxidaseaktivität der Mucosazelle bekannt, so daß wahrscheinlich bereits innerhalb der Zelle der Großteil der Purinbasen zu Urat abgebaut und anschließend als solches resorbiert oder zum Teil wieder aus der Zelle ins Darmlumen resekretiert wird (GRIEBSCH und KAISER, 1976). Eine teilweise Resekretion des in der Darmmucosazelle aus absorbierten Purinnucleosiden gebildeten Urats läßt sich beim Dalmatiner nicht ausschließen.

Vernachläßigt man alle noch in Betracht kommenden, quantitativ aber unbedeutenden Möglichkeiten der Elimination von resorbierten Purinen, z.B. über Haut oder Haare oder den vom Menschen her bekannten oxidativen Abbau von Urat in Blutzellen, besonders in denen der myeloischen Reihe (KAISER, 1976), so läßt sich vermuten, daß die verabreichten Nucleinsäuren nur zu etwa 62% verdaut bzw. resorbiert worden sind. (Es wurden nur 62% der mit der Nahrung aufgenommenen Purine über die Niere ausgeschieden, Abb.6). Die Qualität der Nucleinsäuren übt offenbar einen erheblichen Einfluß auf die Verdaulichkeit aus. Dies wird durch die durchgeführten Untersuchungen mit 2 purinäquivalenten, aber bezüglich der Nucleinsäurenqualität verschiedenartigen Diäten deutlich. Wie in Abbildung 8 bereits gezeigt, stiegen nach der Aufnahme dieser beiden Diäten die Uratspiegel recht unterschiedlich hoch an. Betrachtet man nur die Blutspiegel, so ließe sich der erzielte Effekt mit der unterschiedlichen Zusammensetzung der Nucleinsäuren in den beiden Diäten erklären. Vom Menschen ist bekannt, daß die Aufnahme von freien Purin-Basen einen stärkeren Anstieg der Urat-Plasmaspiegel zur Folge hat, als bei einer purinäquivalenten Aufnahme von Nucleotiden oder Nucleosiden (HAECKEL, 1978). Die SCP-100%-Diät enthielt wesentlich mehr freie Purinbasen als die purinäquivalente RNA-Diät (Tab. 3). Den Einfluß von freien Purinbasen auf den Plasma-Uratspiegel zeigen auch die Abbildungen 2 und 8. Die beiden in Versuch 3.1. und 3.2. beschriebenen sog. SCP-100%-Diäten enthielten wegen des unterschiedlichen, als Nucleinsäurenträger dienenden Single-Cell-Proteins auch unterschiedlich hohe Gehalte an freien Purinbasen, obwohl der Puringehalt insgesamt annähernd gleich war (Tabellen 2 und 3). Nach Verabreichung der Diät mit dem höheren Gehalt an freien Purinbasen stieg der Urat-Plasmaspiegel im Verlauf von 10 Stunden zu einem insgesamt höheren Maximalwert an, fiel dann aber wieder rascher ab (Abb. 2 und 8). Bezieht man aber auch die unterschiedliche Purinausscheidung mit ein, die eine Differenz von 33% ergab (Tab. 14), so muß man annehmen, daß die Verdaulichkeit der Nucleinsäuren der RNA-Diät erheblich geringer war. Die Nucleinsäuren des SCP's liegen, wie eben erwähnt, größtenteils als relativ "geschützte" Nucleoproteine vor.

Bei der RNA-Diät gelangen sofort nach der Futteraufnahme große Mengen "freie" RNA in den Verdauungstrakt. Diese "freien" Nucleinsäuren lassen sich chemisch als phosphatierte Polyanionen auffassen, deren Enzyminhibition schon lange bekannt ist. ZÖLLNER und FELLING (1953) beschrieben die reversible Hemmung von RNAase durch ein sulfatiertes Polyanion, das Heparin. Elektrostatische Kräfte bewirken eine Komplexbildung zwischen den anionischen Polyelektrolyten und dem polykationischen Enzymprotein (MORA, 1962). Die Aktivität des Enzymproteins wird dadurch verändert. Da bei einem Einzellerprotein erst die Zellwände verdaut und anschließend die so freigewordenen Nucleoproteine gespalten werden müssen, ist anzunehmen, daß die Nucleinsäuren protrahierter im Wirkungsbereich der RNAasen und DNAasen anfallen, als dies bei der RNA-Diät zu erwarten ist. So könnte die RNAase-Inhibition der RNA-Diät quantitativ größer ausfallen, und damit die Nucleinsäurenverdaulichkeit in dieser Diät absinken.

## 4.3. Allgemeine Folgerungen

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß Urat, abhängig vom Plasmaspiegel in unterschiedlicher Quantität renal eliminiert wird. Dank der geringen Reabsorption im Nierentubulus besitzt der Dalmatiner ein im Vergleich zum Menschen sehr effizientes Ausscheidungssystem für Urat. Auf die nutritive Aufnahme von Purinen reagiert der Dalmatiner sehr rasch mit einem Anstieg von Urat im Plasma. Selbst bei hoher Belastung erreichen die Plasmawerte aber nach etwa 12 Stunden wieder die Nüchternwerte. Kritische Plasmaspiegel über 380 µmol/l, bei denen die Gefahr der Auskristallisation von Urat besteht, werden beim Dalmatiner bei physiologischer Nierenfunktion und bei artgemäßer Ernährung selbst bei der extrem purinreichen Ernährung in den eigenen Untersuchungen nicht erreicht, so daß dem Dalmatiner wegen seiner Besonderheit im Purinstoffwechsel im Vergleich zu Hunden anderer Rasse nur Nachteile bezüglich einer besonderen Anfälligkeit zu Uratsteinen in den Harnwegen erwachsen. Uratsteine treten speziell beim Dalmatiner gehäuft auf, wogegen bei anderen Hunderassen überwiegend Magnesium-Ammonium-Phosphat-Steine gefunden wurden (BOVEE, 1973). Die Bildung von Uratsteinen wird sicherlich

neben anderen Faktoren wie dem Harnfluß oder dem pH-Wert des Harnes von der Urat-Konzentration im Harn entscheidend mit beeinflußt (Tab. 4 ). Bei der Therapie der Urolithiasis beim Dalmatiner sollten deshalb diätetische Maßnahmen im Sinne einer Verringerung der Purinaufnahme sowie einer ausreichenden Wasserversorgung berücksichtigt werden. Bei schweren Fällen könnte eine lebenslange Behandlung mit Allopurinol in Erwägung gezogen werden. Praktische Erfahrungen scheinen mit dieser Behandlung allerdings noch nicht vorzuliegen. Eine Alkalisierung des Harnes mit dem Ziel Uratsteine aufzulösen wird als wenig aussichtsreich beschrieben (BOVEE, 1973); prophylaktisch zur Verhinderung der Bildung von Uratsteinen scheint dieser Weg aber erfolgversprechend. Neben dem Weg über die Nieren wird beim Dalmatiner Urat erst bei hohen Plasmaspiegeln meßbar über den Gastrointestinaltrakt beseitigt. Ebenso abhängig vom Plasmaspiegel ist die Uratmenge, die in Allantoin umgewandelt wird. Die Verdaulichkeit von Nucleinsäuren hängt offenbar, zumindest beim Dalmatiner von der Form ab, in der sie aufgenommen werden. Möglicherweise werden die Nucleinsäuren abbauenden Enzyme durch ihr eigenes Substrat unspezifisch gehemmt. Aus den analytischen Werten über Puringehalte in der Nahrung alleine können deshalb keine exakten Angaben über metabolische Verfügbarkeit der Nucleinsäuren gemacht werden. Schließlich fiel eine erheblich über der des Menschen liegende endogene Purinsynthese auf, deren Ursachen durch weitere experimentelle Untersuchungen eventuell geklärt werden könnten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Um beim Dalmatiner-Hund den Einfluß der Purinaufnahme sowie der Qualität von Nucleinsäuren in der Nahrung auf den Purinstoffwechsel zu quantifizieren, wurden an insgesamt 8 erwachsenen Dalmatinern beiderlei Geschlechts Stoffwechselversuche bei Verarbreichung von nucleinsäurenhaltigen Diäten mit verschiedenem, aber bekanntem Puringehalt durchgeführt. Hierzu erfolgte in einer Diät mit 25% Casein ein Austausch von 25 - 100% des Caseins durch ein Einzellerprotein, teils auch durch Hefe-RNA. Die Messung von Purinmetaboliten in Harn und Blutplasma wurde ergänzt durch stoffwechselkinetische Untersuchungen über die Metabolisierung und Elimination von (2-$^{14}$C)Urat und Allantoin. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Zwischen der Purinaufnahme und der Urat-Plasmakonzentration 5 Stunden nach der Futteraufnahme bestand eine signifikante lineare Beziehung.

2. Die mittlere renale Purinausscheidung (Urat + Allantoin) aus endogener Synthese wurde mit 0.15 mmol pro kg Lebendmasse und Tag bestimmt.

3. Der molare Urat/Allantoin-Quotient erhöhte sich mit steigender Purinaufnahme von 1.1 (Casein-Diät) bis auf 1.7 und fiel dann bei sehr hoher Purinbelastung bis auf 1.5 ab.

4. Mit steigender Purinaufnahme erhöhte sich die tägliche Purinausscheidung im Harn im Mittel um 0.62 mmol pro 1 mmol aufgenommener Purine.

5. Die Aufnahme von 2 purinäquivalenten, aber bezüglich der Nucleinsäurenqualität differierenden Diäten, ergab sowohl deutliche Unterschiede in Höhe und Verlauf der Urat-Plasmaspiegel als auch in der Menge des über den Harn ausgeschiedenen Urats.

6. Im Fließgleichgewicht bei niedrigem Urat-Plasmaspiegel (36 µmol/l) betrug die Umwandlung für Urat in Allantoin 19% und damit nur etwa halb so viel wie bei einem hohen Plasmaspiegel (114 µmol/l).

7. Die Menge des über den Gastrointestinaltrakt beseitigten Urats war abhängig von der Höhe des Urat-Plasmaspiegels. Bei einem Plasmaspiegel von 114 µmol/l wurden rechnerisch etwa 5% der Urat-Eintrittsrate auf diese Weise eliminiert.

Die Ergebnisse wurden im Hinblick auf die Besonderheit des Dalmatiner-Hundes im Purinstoffwechsel diskutiert.

SUMMARY

In order to quantify the influence of purine intake as well as the quality of dietary nucleic acids on purine metabolism investigations were conducted on 8 adult Dalmatian dogs. Therefore several diets containing a single cell protein with known purine content were fed. In a 25% casein-diet, the casein was consecutively exchanged with the single cell protein until 100% of the casein was replaced. In these investigations purine derivatives in urine and blood plasma were analysed. Kinetic measurements on intermediary metabolism and on elimination of (2-$^{14}$C)uric acid and allantoin substantiated the above mentioned research. The following results were obtained:

1. The amount of purine intake was well correlated with the plasma-uric acid concentration measured 5 h postprandial.

2. Urinary purine excretion (uric acid plus allantoin) from endogeneous synthesis averaged about 0.15 mmol per kg body weight and day.

3. After feeding the casein-diet low in purines, the urate/allantoin-ratio was 1.1. With increasing purine intake this ratio increased to a height of about 1.7 and then declined at very high purine intake levels to about 1.5.

4. The daily purine excretion in urine averaged 62% of the purine intake.

5. The intake of 2 diets, equivalent in purine content, but differing in nucleic acid quality, effected a great difference in the course and height of the plasma-uric acid level as well as in the amount of uric acid excreted in the urine.

6. At a consistently low plasma-uric acid level (36 µmol/l) 19% of the uric acid was transformed into allantoin. This was about half as much as at a consistently high level (114 µmol/l).

7. Excretion of uric acid and allantoin via the gastro-intestinal tract was not high significant even with high plasma uric acid levels, because more than 95% of the purine derivatives (uric acid plus allantoin) were renally excreted.

The results were discussed with emphasis on the biochemical peculiarity in the purine metabolism of the Dalmatian dog.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

AFZELIUS, B.A., 1965

The ocurrence and structure of microbodies: A comparative study.

J. Cell Biol. 26, 835-843

ANDREINI, P.H., DECKER, R.H., TAUXE, W.N., WARD, L.E., 1966

Increased uricolysis in liver homogenates from Dalmatian as compared to Non-Dalmatian-Dogs: Further evidence supporting a cellular transport defect in the Dalmatian.

Arthritis Rheum. 9, 845-851

APPLEMAN, R.M., HALLENBECK, G.A., SHORTER, R.G., 1966

Effect of reciprocal allogeneic renal transplantation between Dalmatian and Non-Dalmatian-Dog on urinary excretion of uric acid.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 1094-1097

BAUDHUIN, P., MÖLLER, M., POOLE, B., DE DUVE, C., 1965

Non mitochondrial oxidizing particles (microbodies) in rat liver and kidney.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 53-59

BENEDICT, S.R., 1916

Uric acid in its relations to metabolism.

Harvey Lect. 11, 346-365

BERLIN, R.D., HAWKINS, R.A., 1968

Secretion of purines by the small intestine: general characteristics.

Am. J. Physiol. 215(4), 932-939

BERTOLINI, J., MASAREI, J.R.L., 1979

The binding of urate by plasma proteins.

Austr. J. Exp. Biol. Med. Science 57(1), 51-60

BIANCHI, R., VITALI, C., CLERICO, A., 1979

Uric acid metabolism in normal subjects and in gouty patients by chromatographic measurement of $^{14}$C-uric acid in plasma and urine.

Metabolism 28(11), 1105-1113

BOVEE, K.C., 1973

Urolithiasis in the dog.

J. Am. Vet. Med. Ass. 162, 1012-1013

BRIGGS, J.P., LEVITT, M.F., ABRAMSON, R.G., 1977

Renal excretion of allantoin in rats:
a micropuncture and clearance study.

Am. J. Physiol. 233(5), F 373-F381

CHRISTEN, P., PEACOCK, W.C., CHRISTEN, A.E., 1970

Urate oxidase in primate phylogenesis.

Europ. Biochem. 12, 3-5

DOCUMENTA GEIGY, 1968

Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage
Redaktion: K. Diem und C. Leutner
Herausgeber: J.R. Geigy AG, Pharma, Basel

FRIEDMAN, M., BYERS, S.O., 1947

Clearance of allantoin in the rat and dog
as a measure of glomerular filtration rates.

Am. J. Physiol. 151, 192-201

FRIEDMAN, M., BYERS, S.O., 1948

Observations concerning the causes of the
excess excretion of uric acid in the Dalmatian dog.

J. Biol. Chem. 175, 727-735

GRIEBSCH, A., KAISER, W., 1976

Einfluß exogener Purine auf den Harnsäure-
stoffwechsel.

In: ZÖLLNER, N., GRÖBNER, W.,: Gicht Handbuch der
Inneren Medizin, Bd. 7, Teil 3, 6. Auflage, 123-138
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

HAECKEL, R., 1978

Diagnostik der Hyperuricämie

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 463-469

HARVEY, A.M., CHRISTENSEN, H.N., 1964

Uric acid transport system: Apparent absence in
erythrocytes of the Dalmatian Coach Hound.

Science 145, 826-827

HAYASHI, H., TAYA, K., SUGA, T., NIINOBE, J., 1976

Studies on peroxisomes.

J. Biochem. 79, 1029-1034

HRUBAN, Z., SWIFT, H., 1964

Uricase: localization in hepatic microbodies.

Science 146, 1316-1317

HRUBAN, Z., RECHCIGL, M., 1969

Microbodies and related particles:
morphology, biochemistry and physiology.

Int. Rev. Cytol., Suppl. 1, 1-296

KAISER, W., 1976

Harnsäureabbau im menschlichen Organismus.

In: ZÖLLNER, N., GRÖBNER, W.,: Gicht Handbuch der Inneren Medizin, Bd. 7, Teil 3, 6. Auflage, 138-142 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg New York

KESSLER, R.H., HIERHOLZER, K., GURD, R.S., 1959

Localization of urate transport in the nephron of mongrel and Dalmatian dog kidney.

Am. J. Physiol. 197, 601-603

KHAN, A.H., WILSON, S., CRAWHALL, J.C., 1975

The influx of uric acid and other purines into everted jejunal sacs of the rat and hamster.

Can. J. Physiol. Pharm. 53(1), 113-119

KLEMPERER, F.W., TRIMBLE, H.C., HASTING, A.B., 1938

The uricase of dogs, including the Dalmatian.

J. Biol. Chem. 125, 445-449

KRAMAR, R., GOLDENBERG, H., BÖCK, P., 1974

Peroxisomes in the liver of the carp.

Histochemistry 40, 137-154

KUSTER, G., SHORTER, R.G., DAWSON, B., HALLENBECK, G.A., 1972

Uric acid metabolism in Dalmatians and other dogs (Role of the Liver).

Arch. Intern. Med. 129, 492-496

LASSEN, U.V., 1961

Kinetics of uric acid transport through the human erythrocyte membrane.

Biochim. Biophys. Acta 53, 557-569

LATA, G.F., MAMRAK, F., BLOCH, Ph., 1977

An electron microscopic and enzymic study of rat liver peroxisomal nucleoid core and its association with urate oxidase.

J. Supramol. Struct. 7, 419-437

LEIGHTON, F., POOLE, B., LAZAROL, P.B., 1969

The synthesis and turnover of rat liver peroxisomes.

J. Cell. Biol. 41, 521-537

MAIER, J., 1979

Untersuchungen zur Eignung des Dalmatiner-Hundes als Modell für alimentäre Hyperuricämie.

Vet. med. Diss., München

MASTERS, C., HOLMES, R., 1977

Peroxisomes: new aspects of cell physiology and Biochemistry.

Physiol. Reviews 57, 816-870

MAZUÉ, G., BERTHE, J., DUPUIS, B., GROS, P., 1977

Etude des principales constantes sanguines du chien Dalmate.

Revue Méd. vêt. 128, 639-652

MERTZ, D.P., 1973

Gicht, Grundlagen, Klinik und Therapie, 2. Auflage.

Georg Thieme Verlag Stuttgart

MERTZ, D.P., 1975

Zur Theorie über die Pathogenese der primären Hyperuricaemie.

Med. Klin. 70, 1187-1198

MORA, J., 1962

Relative importance of electrostatic forces in the interaction of ribonuclease and ribonucleic acid.

J. Biol. Chem. 237(1), 48-61

NOGUCHI, T., TAKADA, Y., FUJIWARA, S., 1979

Degradation of uric acid to urea and glyoxylate in peroxisomes.

J. Biol. Chem. 254, 5272-5275

OH, J.H., DOSSETOR, J.B., BECK, I.T., 1967

Kinetics of uric acid transport and its production in rat small intestine.

Can. J. Physiol. Pharm. 45, 122-131

OROWAN, E., 1955

The origin of man.

Nature 175, 693-712

ROCH-RAMEL, F., WONG, N.L.M., DIRKS, J.H., 1976

Renal excretion of urate in mongrel and Dalmatian dogs: a micropuncture study.

Amer. J. Physiol. 231, 326-331

ROCH-RAMEL, F., 1977

Excrétion rénale de l'acide urique

J. Physiol. Paris 73, 891-901

SACHS, L., 1972

Statistische Auswertungsmethoden.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

SCOTT, J.T., HOLLOWAY, V.P., GLASS, H.J., 1969

Studies of uric acid pool size and turnover rate.

Ann. rheum. Dis. 28, 366- 373

SØRENSEN, L.B., 1960

Elimination of uric acid in man studied by means of $^{14}C$-labelled uric acid.

Scand. J. clin. Lab. Invest. 12 Suppl. 54 (Oslo)

SØRENSEN, L.B., LEVINSON, D.J., 1975

Evidence for four components in the renal handling of uric acid in man.

In: SILBERNAGL, S., LANG, F., GREGER, R.,:amino acid transport and uric acid transport. Symposium Innsbruck, 1975, 243-248

Thieme-Verlag, Stuttgart

SØRENSEN, L.B., 1976

Excretion of uric acid in health and in disease.

In: ZÖLLNER, N., GRÖBNER, W.,: Gicht Handbuch der Inneren Medizin, Bd. 7, Teil 3, 6. Auflage, 142-160

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

WASLIEN, C.J., CALLOWAY, D.H., MARGEN, S., COSTA, F., 1970

Uric acid levels in men fed algae and yeast as protein sources.

Journal of food science 35, 294-298

WEINER, I.M., 1979

Urate transport in the nephron.

Am. J. Physiol. 6(2), F 85- F 92

WELLS, H. G., 1918

The purine metabolism of the Dalmatian-Coach-Hound.

J. Biol. Chem. 35, 221-225

WOLFSON, W.Q., COHN, C., SHORE, C., 1950

The renal mechanism for urate excretion in the Dalmatian-Coach-Hound.

J. Exp. Med. 92, 121-128

YÜ, T.F., GUTMAN, A.B., BERGER, L., KAUNG, C., 1971

Low uricase activity in the Dalmatian dog simulated in mongrels given oxonic acid.

Amer. J. Physiol. 220(4), 973-979

ZÖLLNER, N., FELLING, R., 1953

Nature of inhibition of ribonuclease by heparin.

Am. J. Physiol. 173, 1116-1124

ZÖLLNER, N., GRIEBSCH, A., GRÖBNER, W., 1972

Einfluß verschiedener Purine auf den Harnsäurestoffwechsel.

Ernährungsumschau 3, 79-82

Der Leitung des Instituts sowie Herrn Prof. Dr. E. Scharrer gilt mein Dank für die gewährten Arbeitsmöglichkeiten.

Besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. D. Giesecke für die Überlassung des Themas und die stets gern gewährte Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. M. Stangassinger sei für seine Beratung bei den Isotopenversuchen und Herrn Dr. W. Tiemeyer für die Nucleinsäurenanalytik gedankt.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Labors insbesondere bei Frau S. Wiesmayr und bei Fräulein G. Loibl für ihre freundliche Hilfsbereitschaft.

LEBENSLAUF

| | |
|---|---|
| Name: | Stephan Gaebler |
| 20.11.1951 | Als Sohn von Erwin und Elfriede Gaebler, geb. Zelas in München geboren |
| 1958 - 1962 | Besuch der Moritz von Schwind- Schule, München |
| 1962 - 1964 | Besuch der Gisela Oberrealschule, München |
| 1964 - 1972 | Besuch des Christoph-Scheiner-Gymnasiums, Ingolstadt |
| 1972 | Reifeprüfung am Christoph-Scheiner- Gymnasium, Ingolstadt |
| 1972 - 1974 | Bundeswehr |
| 1974 - 1979 | Studium der Tiermedizin an der Universität München |
| 1979 | Staatsexamen und Approbation als Tierarzt |
| seit 15. November 1979 | Vollbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie, Tierärztliche Fakultät der Universität München |